

Carolina Montanheiro Noronha

INCORPORAÇÃO DE NANOCÁPSULAS DE POLI(ε-CAPROLACTONA) CONTENDO α-TOCOFEROL EM BIOFILMES DE METILCELOULOSE

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do Grau de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto

Florianópolis
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Noronha, Carolina Montanheiro
Incorporação de nanocápsulas de poli (E-caprolactona)
contendo alfa-tocoferol em biofilmes de metilcelulose
[dissertação] / Carolina Montanheiro Noronha ; orientador,
Pedro Luiz Manique Barreto - Florianópolis, SC, 2012.
129 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Nanoencapsulação. 3.
Antioxidantes. 4. Biofilmes. 5. Metilcelulose. I. Barreto,
Pedro Luiz Manique . II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos
Alimentos. III. Título.

Carolina Montanheiro Noronha

**INCORPORAÇÃO DE NANOCÁPSULAS DE POLI(ε-CAPROLACTONA) CONTENDO α-TOCOFEROL EM
BIOFILMES DE METILCELULOSE**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre” em Ciência dos Alimentos, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 19 de setembro de 2012.

Prof.^a. Dr.^a. Roseane Fett
Coordenadora do Programa

Banca Examinadora:

Prof. Pedro Luiz Manique Barreto, Dr.
Orientador - UFSC

Prof.^a Edna Regina Amante, Dr.^a
UFSC

Prof.^a. Elane Schwinden Prudêncio, Dr.^a
UFSC

Prof. Valdir Soldi, Dr.
UFSC

Dedico este trabalho às pessoas que
mais amo:

Meus pais, Fernando e Rosanna, meu
irmão Bê.

Obrigada pelos valiosos e maiores
ensinamentos, incentivo, apoio e amor.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Pedro Luiz Manique pela oportunidade, orientação, ensinamentos, amizade e principalmente por ter acreditado na realização deste trabalho.

Aos membros da banca por aceitarem o convite de participação e pelas contribuições fornecidas

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos - PGCAL pela oportunidade dada na realização do Mestrado e apoio na pesquisa, e à CAPES, pelo apoio financeiro.

A todos os (as) professores (as) do Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, por permitirem a utilização de equipamentos em seus laboratórios.

A Andrea Granada, por ter me auxiliado na metodologia e na utilização do HPLC.

Ao Prof. Dr. Josiel Barbosa Domingos, pela utilização do Nanozetaser.

Ao Prof. Dr. Paulo Ogliari, pelas contribuições feitas durante a análise estatística.

Aos colegas e amigos conquistados no mestrado, Sabrina, Renata, Isabella, Cleonice, Matheus e Jefferson, e às estagiárias, Gabriela, Caroline e Bruna, obrigada pelo companheirismo, informações, conselhos, sugestões e apoio.

Aos demais amigos do Departamento de Ciência dos Alimentos, pelo convívio e amizade durante o tempo que passamos juntos.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica - LCME, pela infraestrutura disponibilizada.

À minha família pelo amor, incentivo e compreensão, que, mesmo distantes, souberam se fazer presentes.

Meus sinceros agradecimentos!

"O estudo em geral, a busca da verdade e da beleza são domínios em que nos é consentido ficar crianças toda a vida."

(Albert Einstein)

RESUMO

NORONHA, Carolina Montanheiro. **Incorporação de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) contendo α -tocoferol em biofilmes de metilcelulose**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC.

O α -tocoferol, isômero da Vitamina E, é um antioxidante natural, amplamente empregado como aditivo em alimentos. No entanto, a utilização de seus efeitos benéficos é limitada devido à sua instabilidade frente às degradações químicas do ambiente, causadas pela oxidação e temperatura. A nanoencapsulação pode ser uma alternativa para proteger o α -tocoferol de um ambiente desfavorável, além de promover uma liberação controlada deste composto. As nanocápsulas também podem ser aplicadas em biofilmes para atuarem como embalagens ativas na preservação dos alimentos. Em vista disso, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de nanocápsulas de α -tocoferol para aplicação em biofilmes de metilcelulose. Suspensões de nanocápsulas foram preparadas pela técnica da nanoprecipitação. A metodologia de superfície de resposta foi empregada para avaliar a influência da quantidade do α -tocoferol e das concentrações dos surfactantes lecitina e Pluronic F68 sobre a eficiência de encapsulação, tamanho de partícula e índice de polidispersão, a fim de se obter condições ótimas para o preparo de nanocápsulas. Foram também avaliadas a estabilidade das suspensões através do potencial zeta, a recuperação total do α -tocoferol e a morfologia das nanocápsulas. As condições ótimas para a encapsulação do α -tocoferol foram obtidas a 200 mg de α -tocoferol, 2,5 mg/mL de lecitina e 1% (m/v) de Pluronic F68, com valores experimentais de 99,97% para eficiência de encapsulação, 184,6 nm para o tamanho de partícula e 0,112 para o índice de polidispersão. Todas as formulações apresentaram uma excelente estabilidade (potencial zeta < -30 mV) e altos valores para a recuperação do α -tocoferol. Partículas esféricas, apresentando uma estrutura capsular, foram visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão. Os biofilmes de metilcelulose foram desenvolvidos pela técnica de “casting” com a adição de três diferentes proporções de nanocápsulas. Foram avaliadas as propriedades mecânicas, a molhabilidade, cor, transmissão de luz, morfologia, atividade antioxidante e liberação do α -

tocoferol para o simulante de alimentos gordurosos. A adição de nanocápsulas nos filmes de metilcelulose diminuiu significativamente a tensão e o módulo elasticidade, porém aumentou a elongação e a espessura, tornando os filmes menos rígidos e mais elásticos. Os filmes com nanocápsulas apresentaram uma maior hidrofobicidade comparado com o filme controle. A luminosidade e cor amarelada foram intensificadas com a incorporação de nanocápsulas. Foram observadas uma alta atividade antioxidante e excelentes propriedades de barreira contra a luz UV e visível. Além disso, houve uma liberação rápida e sustentada do α -tocoferol para o simulante de alimentos.

Palavras-chave: α -tocoferol, nanocápsulas, biofilme, metilcelulose, embalagens ativas, antioxidantes.

ABSTRACT

NORONHA, Carolina Montanheiro. **Incorporation of poly (ϵ -caprolactone) nanocapsules containing α -tocopherol in methylcellulose biofilms**. 2012. Dissertation (MSc in Food Science) - Graduate Program in Food Science, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis - SC.

The α -tocopherol Vitamin E isomer is a natural antioxidant widely used as a food additive. However, the use of its beneficial effects is limited because of its chemical instability in the face of environmental degradation caused by oxidation and temperature. The nanoencapsulation can be an alternative to protect the α -tocopherol in an unfavorable environment, and promote a controlled release of this compound. The nanocapsules can also be added in biofilms to act as active packaging for food preservation. In view of this, the present study aimed at the development of nanocapsules of α -tocopherol for application in methylcellulose biofilms. Nanocapsule suspensions were prepared by the nanoprecipitation method. The response surface methodology was used to evaluate the influence of the amount of α -tocopherol and the surfactants concentrations, lecithin and Pluronic F68, on the encapsulation efficiency, particle size and polydispersity index, in order to obtain optimal conditions for preparing nanocapsules. The stability of suspensions, by the zeta potential, the total recovery of α -tocopherol and morphology of the nanocapsules were also evaluated. The optimum conditions for α -tocopherol encapsulation were obtained at 200 mg of α -tocopherol, 2.5 mg/mL of lecithin and 1% (w/v) of Pluronic F68, with experimental values of 99.97% for encapsulation efficiency, 184.6 nm for the particle size and 0.112 for polydispersity index. All formulations showed excellent stability (zeta potential < -30 mV) and high values of α -tocopherol recovery. Spherical particles, with a capsular structure were visualized by transmission electron microscopy. The methylcellulose biofilms were developed by "casting" by adding three different proportions of nanocapsules. The mechanical properties, wettability, color, light transmission, morphology, antioxidant activity and release of α -tocopherol to the fatty food stimulant were evaluated. The addition of nanocapsules in methylcellulose films significantly reduced the tensile strength and elastic modulus, but increased elongation and thickness, leading to films less rigid and more elastic. Films with nanocapsules showed greater

hydrophobicity compared with the control film. The yellowish color and lightness were enhanced with the incorporation of nanocapsules. A high antioxidant activity and excellent barrier properties against UV light and visible were observed. Furthermore, there was a burst and sustained release of α -tocopherol to the food simulant.

Keywords: α -tocopherol, nanocapsules, biofilm, methylcellulose, active packaging, antioxidants.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1 - Revisão Bibliográfica

Figura 1: Esquema geral do mecanismo da autoxidação lipídica.	32
Figura 2: Mecanismo de ação para os antioxidantes primários.	34
Figura 3: Estruturas dos tocoferóis (a) e tocotrienóis (b)	38
Figura 4: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) composto químico dissolvido no núcleo líquido das nanocápsulas; b) composto químico adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) composto químico retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) composto químico adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas.	40
Figura 5: Método da precipitação de polímeros pré-formados.	41
Figura 6: Polimerização do monômero cíclico ϵ -caprolactona (a) e estrutura química da poli(ϵ -caprolactona).	44

Capítulo 2: Desenvolvimento e Caracterização de Nanocápsulas de PCL Contendo α -Tocoferol

Publicação: Optimization of α -tocopherol loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method for food applications

Figure 1: α -Tocopherol calibration curves obtained by HPLC and the respective regression equation.	70
Figure 2: Chromatogram obtained for α -tocopherol standard solution.	70
Figure 3: Response surface obtained from Box–Behnken design for encapsulation efficiency (%EE) as a function of: a) α -tocopherol amount and Pluronic F68 concentration b) α -tocopherol amount and lecithin concentration and c) Pluronic F68 and lecithin concentrations.	75
Figure 4: Response surface obtained from Box–Behnken design for particle size (PS) as a function of: a) α - tocopherol amount and Pluronic F68 concentration b) α - tocopherol amount and lecithin concentration and c) Pluronic F68 and lecithin concentrations.	77
Figure 5: Response surface obtained from Box–Behnken design for polydispersity index (PDI) as a function of: a) α -	

	tocopherol amount and Pluronic F68 concentration b) α -tocopherol amount and lecithin concentration and c) Pluronic F68 and lecithin concentrations.	78
Figure 6:	Linear correlation plots between observed and predicted values for the %EE, PS and PDI responses.	80
Figure 7:	Transmission electron microscopy (TEM) of α -tocopherol loaded PCL nanocapsules under optimized conditions.	81

Capítulo 3: Desenvolvimento e Caracterização de Filmes de Metilcelulose Contendo Nanocápsulas de α -Tocoferol

Publicação: Characterization of antioxidant methylcellulose film incorporated with α -tocopherol nanocapsules

Figure 1:	Pictures of film types in two different liquids used to determine the contact angle.	105
Figure 2:	SEM micrographs of a) film control cross-section, b) film control surface, c) 30%NCs film cross-section, d) 30%NCs film surface, e) 50%NCs film cross-section, f) 50%NCs film surface, g) 70%NCs film cross-section and h) 70%NCs film surface. Magnification is indicated in the micrographs.	108
Figure 3:	DPPH scavenging activity (%) of MC film control and incorporated with NCs. Values are given as mean + standard deviation. Different letters indicate significantly different ($p < 0.05$) when analyzed by Duncan's New Multiple Range Test.	109
Figure 4:	ABTS radical scavenging activity of MC film control and incorporated with NCs. Values are given as mean + standard deviation. Different letters indicate significantly different ($p < 0.05$) when analyzed by Duncan's New Multiple Range Test.	110
Figure 5:	α -Tocopherol concentration release rate into 95% ethanol at 20°C.	111
Figure 6:	α -Tocopherol release rate (Mt/M ∞) into 95% ethanol at 20°C.	112

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2: Desenvolvimento e Caracterização de Nanocápsulas de PCL Contendo α -Tocoferol

Publicação: Optimization of α -tocopherol loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method for food applications

Table 1: Coded and uncoded variables used in the Box-Behnken design.	68
Table 2: Observed values of responses for the Box-Behnken design.	72
Table 3: Values of regression coefficients and significance of the components for the quadratic model for responses Y_1 , Y_2 and Y_3 .	73

Capítulo 3: Desenvolvimento e Caracterização de Filmes de Metilcelulose Contendo Nanocápsulas de α -Tocoferol

Publicação: Characterization of antioxidant methylcellulose film incorporated with α -tocopherol nanocapsules

Table 1: Thickness, elastic modulus, tensile strength and % elongation at break of methylcellulose films incorporated with NCs.	103
Table 2: Contact angle ($^\circ$) and Surface free energy (γ) of MC films incorporated with NCs to two different liquids.	106
Table 3: Color values and transparency of MC films incorporated with NCs.	107

LISTA DE ABREVIATURAS

α -TP - α -tocopherol
ABTS - 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid
ANOVA - analysis of variance
BHA - butil-hidroxianisol
BHT - butil-hidroxitolueno
 ΔE_{ab} - total color difference
DPPH - 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
% E - percentage elongation at break
% EE - encapsulation efficiency
EM - elastic modulus
HPLC - high performance liquid chromatography
MC - metilcelulose/methylcellulose
MEV - microscopia eletrônica de varredura
MET - microscopia eletrônica de transmissão
NCs - nanocapsule suspension
PCL - poli(ϵ -caprolactona)/ poly ϵ -caprolactone
PDI - polydispersity index
PEBD - polietileno de baixa densidade
PP - polipropileno
PS - particle size
RSM - response surface methodology
SEM - scanning electron microscopy
TBHQ - t-butil-hidroquinona
TEAC - trolox equivalent
TEM – transmission electron microscopy
TS - tensile strength
UV – ultravioleta/ ultraviolet

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	25
OBJETIVOS	27
Objetivo Geral	27
Objetivos específicos	27
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
1 Oxidação lipídica	31
2 Antioxidantes nos alimentos	33
3 Tocoferóis	37
3.1 Mecanismo de ação dos tocoferóis	39
4 Sistemas nanoparticulados	40
4.1 Propriedades físico-químicas de sistemas nanoparticulados	43
5 Policaprolactona	44
6 Biofilmes	45
6.1 Metilcelulose	45
6.2 Propriedades físico-químicas dos filmes	48
6.2.1 <i>Propriedades mecânicas</i>	48
6.2.2 <i>Propriedades ópticas</i>	49
6.2.3 <i>Análise colorimétrica</i>	49
6.2.4 <i>Propriedades estruturais</i>	49
6.2.5 <i>Cinéticas de liberação de composto ativo</i>	50
6.3 Sistemas de liberação controlada	50
7 Embalagens ativas	52
7.1 Embalagens antioxidantes	53
Capítulo 2: Desenvolvimento e Caracterização de Nanocápsulas de PCL Contendo α-Tocoferol	
<i>Publicação: Optimization of α-tocopherol loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method for food applications</i>	
Introdução	59
Abstract	64
1 Introduction	65
2 Materials and Methods	66
2.1 Materials	66
2.2 Preparation of PCL nanocapsule suspensions containing α -tocopherol	66
2.3 Box-Behnken design	67

2.4 Particle mean size (PS), polydispersion index (PDI) and zeta potential (ζ)	68
2.5 α -Tocopherol content, recovery and encapsulation efficiency	68
2.5.1 <i>Chromatographic analysis</i>	69
2.6 Transmission electron microscopy	70
3 Results and discussion	71
3.1 Stability of nanocapsules	71
3.2 Experimental design	71
3.3 Response surface plotting	73
3.3.1 <i>Encapsulation efficiency (%)</i>	74
3.3.2 <i>Particle size (PS)</i>	75
3.3.3 <i>Polydispersity index</i>	77
3.4 Optimisation of conditions for encapsulating α -tocopherol	78
3.5 Morphology evaluation	81
Conclusions	82
References	82

Capítulo 3: Desenvolvimento e Caracterização de Filmes de Metilcelulose Contendo Nanocápsulas de α -Tocoferol

Publicação: Characterization of antioxidant methylcellulose film incorporated with α -tocopherol nanocapsules

Introdução	89
Abstract	94
1 Introduction	95
2 Materials and Methods	96
2.1 Materials	96
2.2 Methods	97
2.2.1 <i>Preparation of PCL nanocapsule suspensions containing α-tocopherol</i>	97
2.2.2 <i>Film preparation</i>	97
2.2.3 <i>Film thickness</i>	98
2.2.4 <i>Mechanical properties</i>	98
2.2.5 <i>Wettability and surface free energy</i>	98
2.2.6 <i>Color measurement</i>	99
2.2.7 <i>Light transmission</i>	99
2.2.8 <i>Microscope observations</i>	99
2.2.9 <i>Determination of antioxidant activity</i>	100
2.2.9.1 <i>DPPH assay</i>	100
2.2.9.2 <i>ABTS assay</i>	100

2.2.10 <i>Release tests</i>	101
2.2.10.1 <i>High performance liquid chromatographic analysis</i>	101
2.3 Statistical analysis	102
3. Results and discussion	102
3.1 Film thickness	102
3.2 Mechanical properties	103
3.3 Wettability and surface free energy	104
3.4 Color measurement	106
3.5 Light transmission	107
3.6 Scanning electron microscopy	107
3.6 Antioxidant activity	109
3.7 Release tests	111
Conclusion	113
References	113
CONCLUSÕES GERAIS	119
REFERÊNCIAS	121

INTRODUÇÃO

As embalagens são elementos importantes nas estratégias decisivas como vantagem competitiva na indústria de alimentos. Além disso, possuem papel fundamental no controle das interações entre o alimento e o ambiente, protegendo e auxiliando na manutenção da qualidade do produto (TAWFIK; HUYGHEBAERT, 1999; SOARES et al., 2009).

A indústria de alimentos envolve uma série de materiais de embalagem, sendo que a grande maioria são plásticos derivados do petróleo, causando problemas ambientais devido à geração de elevadas quantidades de resíduos sólidos não degradáveis no ambiente (SOTHORNVIT; PITAK, 2007). Portanto, há constante desafio visando atender às exigências dos consumidores, fornecendo embalagens modernas, práticas, que preservem os alimentos e que sejam viáveis ambiental e economicamente (SOARES et al., 2009).

Nas últimas décadas, novas tecnologias de embalagens vêm sendo desenvolvidas em resposta a essa demanda. A embalagem ativa é uma das invenções mais inovadoras na área de embalagens de alimentos. Diferentemente das embalagens tradicionais, as embalagens ativas interagem com os alimentos promovendo a manutenção, ou mesmo a melhoria da qualidade do produto, estendendo sua vida de prateleira (DAINELLI et al., 2008). Nesse sentido, vem aumentando o número de pesquisas para o desenvolvimento de novos materiais para uso em embalagens, como, por exemplo, filmes biodegradáveis e comestíveis. As principais características destes filmes incluem a natureza renovável da fonte de seus ingredientes (biopolímeros), a habilidade destes filmes em funcionar como suportes de aditivos alimentares e o uso potencial em sistemas alimentares como barreira ao transporte de vapores, gases e solutos (BARRETO, 2003).

Embora as embalagens tradicionais tenham contribuído grandemente com os primeiros desenvolvimentos do sistema de distribuição de alimentos, elas não são suficientes para atender às novas exigências dos consumidores por produtos mais próximos ao natural, contendo menos conservantes e que sejam seguros (YAM et al., 2005). Apesar de serem uma boa barreira contra o oxigênio e odores, o produto fica mais exposto à luz, o que pode afetar a estabilidade oxidativa do alimento. Sendo assim, a utilização de embalagens adequadas e a adição de antioxidantes (naturais ou sintéticos) podem aumentar a vida de útil de muitos produtos alimentícios (HILST, 1999; HRAS et al., 2000). No entanto, a utilização dos antioxidantes sintéticos, como BHA (butil-

hidroxianisol), BHT (butil-hidroxitolueno) e TBHQ (t-butil-hidroquinona), vem diminuindo por apresentarem restrições em diversos países devido aos seus possíveis efeitos indesejáveis para saúde humana, além da suspeita de serem promotores do processo de carcinogênese (HILST, 1999; SUJA et al., 2004). Sendo assim, o uso de antioxidantes naturais na indústria de alimentos tem aumentado significativamente e muitos compostos têm sido testados em sua eficácia como antioxidantes, principalmente os tocoferóis (ISNARDY et al., 2003; NOGALA-KALUCKA et al., 2005).

Entre as diversas categorias de Vitamina E, o α -tocoferol é um antioxidante lipossolúvel que tem sido utilizado como aditivo em alimentos. No entanto, a utilização de seus efeitos benéficos é limitada, pois esse componente é lábil ao aquecimento e ao oxigênio. Esses impedimentos para a aplicação do α -tocoferol podem ser contornados aplicando-se as tecnologias da nanoencapsulação a fim de protegê-lo de um ambiente desfavorável (YOO et al., 2006).

O potencial uso das nanopartículas poliméricas para o sistema de liberação de compostos ativos é extensivamente investigado nos últimos anos. Para isso, as nanopartículas poliméricas devem ser compostas por um polímero biodegradável e biocompatível, apresentando diâmetro e distribuição granulométrica controlada (LEGRAND et al., 1999).

A nanotecnologia é uma das tecnologias mais inovadoras do século atual, cujas aplicações são imensas, tornando-a cada vez mais importante para o setor de alimentos. Novas pesquisas estão sendo conduzidas na indústria de alimentos para melhorar a qualidade e segurança dos produtos através das aplicações da nanotecnologia (SOZER; KOKINI, 2009). Desta forma, a nanotecnologia pode influenciar o setor de embalagens através da adição de nanopartículas em matrizes poliméricas. A incorporação de nanopartículas nos filmes pode trazer a dupla vantagem de melhorar as características do material de embalagem e promover uma funcionalidade adicional (antimicrobiana, antioxidante, entre outras) (SEKHON, 2010).

Neste contexto, este trabalho foi dividido em duas etapas. A primeira etapa propõe o desenvolvimento de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) contendo α -tocoferol através da técnica da nanoprecipitação. A metodologia de superfície de resposta foi aplicada a fim de obter uma formulação de nanocápsulas com a melhor eficiência de encapsulação, menor tamanho e menor índice de polidispersão. Além disso, outros critérios como, estabilidade das suspensões de nanocápsulas, recuperação do α -tocoferol e a morfologia das

nanocápsulas também foram avaliadas. Na segunda etapa, foram produzidos biofilmes de metilcelulose com a incorporação da formulação ótima de nanocápsulas em diferentes proporções, e estes foram posteriormente caracterizados por diferentes técnicas.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O principal objetivo do trabalho foi o desenvolvimento e a incorporação de nanocápsulas poliméricas contendo α -tocoferol em matrizes polissacarídicas de metilcelulose, conferindo a capacidade antioxidante e melhorias nas propriedades físico-químicas para aplicação em embalagens de alimentos.

Objetivos específicos

- Obter nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) com alto teor de α -tocoferol pelo método da nanoprecipitação
- Determinar a eficiência de encapsulação, tamanho de partículas e índice de polidispersão variando a quantidade de α -tocoferol e as concentrações de surfactantes, a fim de se obter condições ótimas de encapsulação do α -tocoferol.
- Caracterizar as nanopartículas quanto à morfologia e a estabilidade através do potencial zeta.
- Desenvolver biofilmes de metilcelulose com a incorporação das suspensões de nanocápsulas.
- Caracterizar os biofilmes quanto às propriedades mecânicas, características de molhabilidade, cor, transmissão de luz e morfologia.
- Avaliar a atividade antioxidante dos biofilmes, bem como o perfil de liberação do α -tocoferol no simulante de alimentos.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 Oxidação lipídica

Os lipídios são constituídos por uma mistura de tri, di e monoacilgliceróis, ácidos graxos livres, glicolipídios, fosfolipídios, esteróis e outras substâncias que desempenham um papel importante na qualidade de alguns alimentos, particularmente em relação às propriedades sensoriais que os tornam desejáveis, como, sabor, aroma, cor e textura. Além disso, conferem valor nutritivo aos alimentos, constituindo uma fonte de energia metabólica, de ácidos graxos essenciais (ex. ácidos linoléico, linolênico e araquidônico) e de vitaminas lipossolúveis (ex. A, D, E e K) (SILVA et al., 1999; RAMALHO; JORGE, 2006).

A utilização dos lipídios na indústria alimentícia confere um risco potencial no manejo e na conservação das matérias primas e dos produtos que os contém, pois os óleos comestíveis que possuem moléculas insaturadas são susceptíveis ao ataque molecular do oxigênio. Esse processo é conhecido como oxidação lipídica, responsável não somente pelo desenvolvimento de compostos voláteis indesejáveis, como sabores e odores característicos do ranço, mas também por afetar a qualidade nutricional devido à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, além da formação de produtos de oxidação potencialmente tóxicos, tornando os alimentos impróprios para consumo (FRANKEL; EVANS; COONEY, 1996; VALENZUELA; NIETO, 2001; O'BRIAN; O'CONNER, 2002).

Existem diversos sistemas catalíticos que podem oxidar os lipídios. Dentre eles estão a exposição à luz, temperatura, enzimas, metais, metaloproteínas e microorganismos. Os produtos voláteis da oxidação lipídica incluem os aldeídos, cetonas, álcoois, ésteres, lactonas e hidrocarbonetos, sendo os aldeídos e cetonas insaturadas os principais responsáveis pelo indesejável sabor e aroma de ranço (O'BRIAN; O'CONNER, 2002).

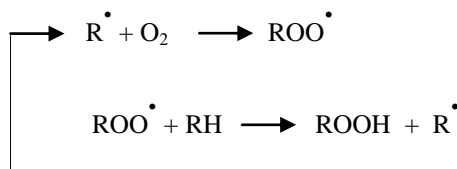
A ingestão de alimentos contendo lipídios oxidados é preocupante já que os produtos de oxidação lipídica podem promover a oxidação *in vivo*. Por esse motivo, há um crescente interesse entre os pesquisadores sobre os problemas causados pela oxidação lipídica em relação ao estado de saúde. Acredita-se que a oxidação lipídica *in vivo* desempenha um importante papel etiológico na doença coronariana, aterosclerose, câncer, processo de envelhecimento e muitas outras doenças (EITENMILLER; LEE, 2004).

A degradação oxidativa dos lipídios pode ocorrer por várias vias, tais como: reações hidrolíticas, causadas pelas enzimas lipase ou pela ação de calor e umidade; oxidação enzimática, que ocorre pela ação das enzimas lipoxigenases que atuam sobre os ácidos graxos poliinsaturados; fotoxidação, promovida essencialmente pela radiação UV em presença de fotossensibilizadores (clorofila, mioglobina, riboflavina e outros); e por último, a autooxidação, considerada o principal mecanismo de oxidação dos óleos e gorduras, é um processo dinâmico que evolui ao longo do tempo. A autooxidação é um fenômeno complexo que envolve reações radiculares capazes de auto-propagação, divididas em três etapas de evolução oxidativa: iniciação, propagação e terminação. A Figura 1 demonstra a sequência de reações inter-relacionadas para explicar o processo da autooxidação lipídica (SILVA et al., 1998; RAMALHO; JORGE, 2006).

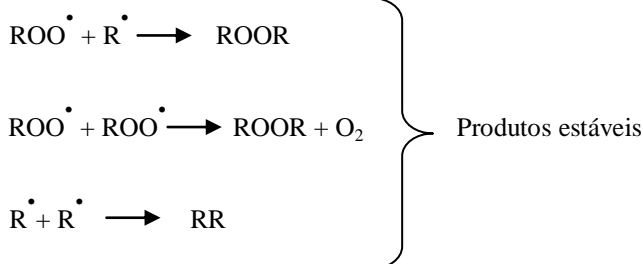
Iniciação



Propagação



Término



Onde: RH – Ácido graxo insaturado; R^{\bullet} – Radical livre; ROO^{\bullet} – Radical peróxido e ROOH – Hidroperóxido

Figura 1: Esquema geral do mecanismo da autooxidação lipídica.
Fonte: Ramalho e Jorge (2006).

Condições favorecidas por luz e calor desencadeiam o processo de formação dos radicais livres na etapa de iniciação. É nesta etapa que ocorre o desaparecimento dos substratos de oxidação, seguida da formação dos radicais livres do ácido graxo pela retirada de um hidrogênio em sua molécula. Na etapa seguinte, de propagação, os radicais livres susceptíveis ao ataque do oxigênio atmosférico são convertidos em outros radicais, originando os produtos primários de oxidação (peróxidos e hidroperóxidos) que atuam como propagadores da reação. Por último, na etapa de término, ocorre o aparecimento de produtos secundários de oxidação através da cisão e rearranjo de dois radicais livres (epóxidos, compostos voláteis e não voláteis), formando produtos estáveis (SILVA et al., 1998; RAMALHO; JORGE, 2006).

Para evitar a oxidação lipídica há uma necessidade de diminuir a incidência dos fatores que a favorecem através de métodos efetivos de controle, que incluem a minimização dos níveis de energia (temperatura e luz), responsáveis pelo desencadeamento do processo de formação dos radicais livres, a eliminação de traços metálicos, a proteção contra o oxigênio e a utilização de antioxidantes, os quais, em pequenas quantidades, bloqueiam a formação de radicais livres, interferindo nos processos de oxidação de lipídios (FRANKEL; EVANS; COONEY, 1996; RAMALHO; JORGE, 2006).

2 Antioxidantes nos alimentos

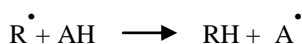
Em um sistema biológico, um antioxidante pode ser definido como “qualquer substância que quando presente em baixas concentrações, em comparação ao substrato oxidável, retarda ou previne significativamente a oxidação do mesmo”. O substrato oxidável pode ser uma molécula encontrada em alimentos ou em material biológico, incluindo carboidratos, DNA, lipídios e proteínas. Os alimentos são sistemas compostos por uma variedade de biomoléculas e, esta definição descreve bem um antioxidante. Entretanto, os órgãos que regulamentam a área classificam os antioxidantes como um aditivo alimentar e os define como “substâncias utilizadas para preservar o alimento por retardar a deterioração, a rancidez ou a descoloração devida à oxidação” (*Code of Federal Regulations, Food and Drug Administration*) (WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005).

Os antioxidantes podem ocorrer como constituintes naturais dos alimentos, e também podem ser adicionados intencionalmente em produtos. O uso de substâncias para melhorar a qualidade dos alimentos

através do retardamento da oxidação lipídica tem sido praticado por séculos, embora seu mecanismo não fosse compreendido. O primeiro registro científico de inibidores da oxidação foi observado por Berthollet em 1797. O mais antigo trabalho relatado sobre a utilização de antioxidantes no retardo da oxidação lipídica surgiu em 1843, em que Deschamps mostrou que uma pomada feita de banha fresca contendo goma de benjoim não se tornou rançosa como ocorreu com a banha pura. Desde os anos 1960, o entendimento da autooxidação de lipídios insaturados e mecanismos antioxidantes têm avançado significativamente como resultado do desenvolvimento de ferramentas analíticas eficazes. Nas duas últimas décadas, o uso de antioxidantes na indústria de alimentos e seus mecanismos funcionais têm sido amplamente estudados (WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005; RAMALHO; JORGE, 2006).

Os antioxidantes podem ser agrupados de acordo com seu mecanismo de ação: primários, secundários, sequestradores de oxigênio, sinergistas, enzimáticos e agentes quelantes (WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005; MUKHOPADHYAY, 2006).

Os antioxidantes primários são compostos fenólicos que promovem a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia. Ex., tocoferóis, alquil galatos, BHT, BHA, TBHQ, etc. Frankel, Evans e Cooney (1996) apresentou o mecanismo de ação representado pela Figura 2.



Onde: RO^\bullet e R^\bullet – radicais livres; AH – antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo e A^\bullet – radical inerte

Figura 2: Mecanismo de ação para os antioxidantes primários.

Fonte: Frankel, Evans e Cooney (1996).

O átomo de hidrogênio ativo do antioxidante é abstraído pelos radicais livres R^\bullet e ROO^\bullet com maior facilidade que os hidrogênios alílicos das moléculas insaturadas. Assim formam-se espécies inativas para a reação em cadeia e um radical inerte (A^\bullet) procedente do antioxidante. Este radical, estabilizado por ressonância, não tem a capacidade de iniciar ou propagar as reações oxidativas (RAMALHO; JORGE, 2006).

Antioxidantes secundários, também classificados como antioxidantes preventivos, são compostos que possuem a função de decompor os hidroperóxidos em produtos finais estáveis. Eles geralmente aumentam a atividade antioxidante dos antioxidantes primários (WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005; MUKHOPADHYAY, 2006).

Os sequestradores de oxigênio são substâncias que atuam capturando o oxigênio presente no meio, através de reações químicas estáveis tornando-os, conseqüentemente, indisponíveis para atuarem como propagadores da autooxidação. Ex., ácido ascórbico (Vitamina C), ascorbil palmitato, ácido eritórlico (MUKHOPADHYAY, 2006).

Os sinergistas são substâncias com pouca ou nenhuma atividade antioxidante, que possuem efeito cooperativo com outros compostos para aumentar a sua atividade antioxidante (WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005; RAMALHO; JORGE, 2006).

Os antioxidantes enzimáticos atuam na remoção do oxigênio dissolvido ou de espécies altamente reativas de um sistema alimentício. Ex., glucose oxidase, superóxido dismutase e catalases (MUKHOPADHYAY, 2006; RAMALHO; JORGE, 2006).

Os agentes quelantes complexam íons metálicos, principalmente cobre e ferro, que catalisam a oxidação lipídica. Um par de elétrons não compartilhado na sua estrutura molecular promove a ação de complexação. Ex., ácido cítrico e seus sais, fosfatos e sais de ácido etileno diamino tetra acético (EDTA) (MUKHOPADHYAY, 2006; RAMALHO; JORGE, 2006).

Apesar de a utilização de antioxidantes ser conhecida desde a antiguidade, quando ervas e especiarias eram usadas na preservação de alimentos, a tecnologia moderna de antioxidantes se deu há cerca de 60 anos. Uma vez que os radicais livres foram descobertos como os responsáveis pela oxidação lipídica, centenas de compostos naturais e sintéticos foram avaliados quanto à sua eficácia como sequestradores de radicais ou pelos seus outros efeitos inibitórios. Entre eles, apenas quatro antioxidantes sintéticos são amplamente utilizados em alimentos:

butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG). Os cientistas estão tentando desenvolver novos antioxidantes sintéticos destinados a retardar os danos induzidos por radicais livres em vários produtos alimentícios, bem como nas células do corpo humano. Os antioxidantes sintéticos utilizados na indústria podem ser adicionados como aditivos diretos ou indiretamente através da difusão do material da embalagem (SHAHIDI; ZHONG, 2005).

Embora antioxidantes sintéticos tenham sido amplamente empregados na indústria de alimentos, existem alguns argumentos sobre a sua segurança. A utilização de BHA e BHT em alimentos foi diminuída devido à sua ação potencial como promotores da carcinogênese. De acordo com a literatura, estudos têm demonstrado a possibilidade de o BHA e BHT apresentarem efeito carcinogênico em experimentos com animais. O órgão alvo para o BHA foi o trato gastrointestinal de roedores, enquanto o BHT apresentou efeitos carcinogênicos no fígado de ratos e camundongos. Além disso, o BHA e o BHT mostraram ser citotóxicos, apresentando também possíveis efeitos adversos sobre o rim, bem como os tecidos pulmonares de ratos. No entanto, os efeitos do BHA e BHT em humanos ainda não estão bem estabelecidos (BOTTERWECK et al., 2000; SHAHIDI; ZHONG, 2005). Por estes motivos, o uso destes antioxidantes em alimentos é limitado. Em alguns países, como o Canadá e na Comunidade Européia o uso do TBHQ não é permitido (RAMALHO; JORGE, 2006)

Tendo em vista os indícios de problemas que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, o interesse em antioxidantes naturais continua a crescer, pois se presume que sejam seguros, uma vez que ocorrem naturalmente nos alimentos, além de serem utilizados há séculos. Pesquisas têm sido dirigidas no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associações entre eles, com intuito de diminuir sua quantidade nos alimentos (FRANKEL; EVANS; COONEY, 1996; SOARES, 2002; RAMALHO; JORGE, 2006).

Entre os antioxidantes naturais mais utilizados podem ser citados tocoferóis, ácidos fenólicos e extratos de plantas como alecrim e sálvia. O tocoferol, componente da Vitamina E, por ser um dos melhores antioxidantes naturais é amplamente aplicado como meio para inibir a oxidação dos óleos e gorduras comestíveis, prevenindo a oxidação dos ácidos graxos insaturados (RAMALHO; JORGE, 2006).

3 Tocoferóis

O termo vitamina E foi introduzido em 1922 por Evans e Bishop, que descreveram um fator da dieta na nutrição animal considerado importante para a reprodução normal. Em 1936 dois compostos ativos foram isolados de óleo de germe de trigo e designados como α - e β -tocoferol, termo derivado das palavras gregas “tocos” (parto), “phorein” (conceber) e “ol” (álcool). Nos anos seguintes, dois tocoferóis, γ - e δ -tocoferol, bem como os tocotrienóis foram isolados de óleos vegetais comestíveis, e hoje um total de quatro tocoferóis e quatro tocotrienóis são conhecidos (AZZI; STOCKER, 2000; HENSLEY et al., 2004). Os α -, β -, γ - e δ -tocoferóis ocorrem como misturas em óleos vegetais e são os antioxidantes naturais mais importantes em gorduras (HRAS et al., 2000).

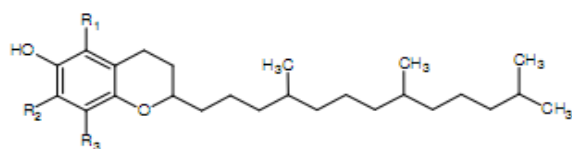
Os tocoferóis são solúveis em óleo e, portanto, totalmente solúveis em solventes lipofílicos e insolúveis em água. Apresentam característica de líquidos viscosos de cor geralmente amarela claro (sintéticos) ou marrom (concentrado natural), alguns dos quais podem cristalizar a temperatura ambiente (23°C) e a temperaturas mais baixas. No estado de grande pureza são relativamente inodoros e incolores (JOHNSON; PETERSON, 2001; SHAHIDI; ZHONG, 2005).

Os compostos de vitamina E (tocoferóis e tocotrienóis) são reconhecidos por sua eficaz inibição da oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos, e também por seus mecanismos como antioxidantes. A atividade antioxidante dos tocoferóis e tocotrienóis é principalmente devido à sua capacidade de doar seus hidrogênios fenólicos aos radicais livres lipídicos (EITENMILLER; LEE, 2004).

A molécula de vitamina E pode ser dividida em duas partes, um sistema aromático hidroxilado (um anel fenólico e um heterocíclico, chamado de anel cromanol) responsável por suas propriedades antioxidantes e também uma cadeia lateral ramificada saturada com 16 carbonos (tocoferol) ou insaturada com três duplas ligações na cadeia lateral (tocotrienol), para a orientação da vitamina E na membrana lipídica. Os tocotrienóis, embora significantes em óleo de palma, são geralmente menos comuns do que os tocoferóis e muito menos conhecidos acerca de suas propriedades biológicas. Os quatro tocoferóis e tocotrienóis diferem no número de grupamentos metila junto ao anel heterocíclico. Eles são designados α (5, 7, 8-trimetil), β (5, 7-dimetil), γ (7, 8-dimetil) e δ (8-metil). As formas β - e γ - são isômeros posicionais,

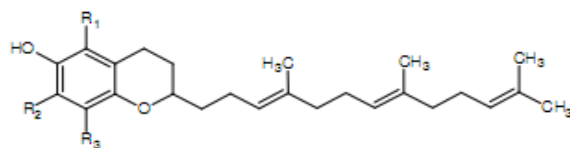
como pode ser observado na Figura 3 (ABIDI, 2003; YOSHIDA et al. 2003; REZK et al, 2004; SHAHIDI; ZHONG, 2005).

A demanda por produtos de vitamina E aumentou nas últimas décadas e contribuiu para o rápido crescimento do número de produtos disponíveis nas indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética. A tecnologia de fabricação de produtos para aplicações específicas é sofisticada, incluindo a microencapsulação, e para tais aplicações, a estabilidade oxidativa da vitamina E é requerida. A utilização da microencapsulação ou revestimentos para proteger os tocoferóis e tocotrienóis pela formação de uma barreira ao oxigênio, permite uma maior utilização de formas não-esterificadas (EITENMILLER; LEE, 2004).



R ₁	R ₂	R ₃	
CH ₃	CH ₃	CH ₃	α-tocoferol
CH ₃	H	CH ₃	β-tocoferol
H	CH ₃	CH ₃	γ-tocoferol
H	H	CH ₃	δ-tocoferol

(a)



R ₁	R ₂	R ₃	
CH ₃	CH ₃	CH ₃	α-tocotrienol
CH ₃	H	CH ₃	β-tocotrienol
H	CH ₃	CH ₃	γ-tocotrienol
H	H	CH ₃	δ-tocotrienol

(b)

Figura 3: Estruturas dos tocoferóis (a) e tocotrienóis (b)

Fonte: Shahidi e Zhong (2005).

3.1 Mecanismo de ação dos tocoferóis

Os tocoferóis inibem a propagação de radicais livres por doação de hidrogênio do seu grupo fenólico para radicais livres lipídicos, a fim de estabilizá-los pela produção de radicais tocoferoxil na reação de terminação, rendendo produtos de oxidação muito menos reativos que os radicais livres lipídicos, estendendo desta maneira a vida útil dos óleos comestíveis (VALENZUELA; NIETO, 2001; ISNARDY et al., 2003; REZK et al, 2004; NOGALA-KALUCKA et al., 2005).

Durante a armazenagem dos óleos vegetais, os tocoferóis são convertidos em radicais livres, como os outros antioxidantes. Estes radicais livres então polimerizam em uma mistura de dímeros e oligômeros maiores. Estes compostos oligoméricos também possuem atividade antioxidante moderada. Copolímeros de radicais livres de tocoferol com radicais livres gerados pela decomposição de hidroperóxidos lipídicos também são formados. Se o óleo ou alimento contém íons ferro ou cobre, estes oxidam os tocoferóis com formação de várias quinonas reativas, as quais facilmente polimerizam e copolimerizam (POKORNÝ; PARKANYIOVÁ, 2005).

O α -tocoferol é a forma mais biologicamente ativa entre os compostos da vitamina E. A atividade antioxidante dos tocoferóis aumenta da seguinte forma: α -tocoferol > γ -tocoferol > β -tocoferol > δ -tocoferol (LIEN et al., 1999). No entanto, a atividade antioxidante real dos tocoferóis em óleos comestíveis é evidente quando os tocoferóis são adicionados aos triglicerídios puros dos óleos vegetais, cujos tocoferóis naturais foram removidos através da destilação com vapor de água. Nesse caso, a atividade antioxidante dos tocoferóis aumenta da seguinte maneira: α -tocoferol > γ -tocoferol > β -tocoferol > δ -tocoferol (POKORNÝ; PARKANYIOVÁ, 2005).

A participação dos tocoferóis nas reações de autooxidação leva a sua degradação e consumo, presumivelmente por oxidação (VERLEYEN et al., 2001), formando quinonas, hidroquinonas, tocoferóxidos dímeros e trímeros. Na ausência de oxigênio são relativamente estáveis a luz, ao calor e aos álcalis. Os ésteres preparados por acilação do hidróxi fenólico livre aumentam a estabilidade dos compostos ao oxigênio (JOHNSON; PETERSON, 2001; NOGALA-KALUKA et al., 2005).

4 Sistemas nanoparticulados

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de compostos químicos que apresentam diâmetro inferior a 1 μm . O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural (Figura 4). As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo líquido, podendo a substância estar dissolvida neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado as nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica, onde a substância química pode ficar retida ou adsorvida (SCHAFFAZICK et al., 2003). A poli(ϵ -caprolactona) merece destaque dentre os polímeros comumente utilizados, devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades mecânicas (GUTERRES et al., 2007).

Dentre as partículas poliméricas, ressaltam-se as nanocápsulas, pois apresentam alto potencial de encapsulamento de substâncias, especialmente as lipofílicas, sendo capazes de controlar a sua liberação, aumentar a estabilidade de armazenamento e de gerar respostas adequadas por períodos de tempo prolongado (SCHAFFAZICK et al., 2003; GUTERRES et al., 2007).

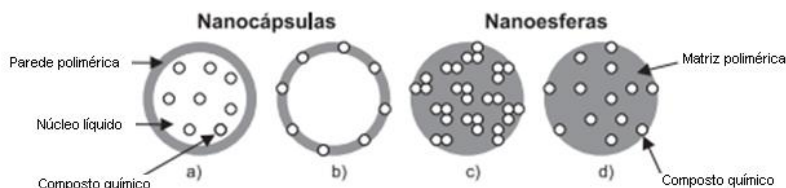


Figura 4: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) composto químico dissolvido no núcleo líquido das nanocápsulas; b) composto químico adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) composto químico retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) composto químico adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas.

Fonte: Schaffazick, et al. (2003).

A vantagem que as nanocápsulas apresentam em relação a outros sistemas carreadores e emulsões é de conferir proteção da substância ativa nela incorporada frente à degradação química, uma vez que a substância ativa fica retida no interior de uma matriz sólida ou de um

invólucro polimérico que também tem a função de controlar a liberação da substância ativa ao meio de dispersão (DINGLER et al., 1999).

Diversos métodos de preparação de nanocápsulas são encontrados na literatura, e de uma forma geral, são classificados em métodos baseados em polimerização *in situ* de monômeros dispersos ou na polimerização de polímeros pré-formados (SCHAFFAZICK et al., 2003). Dentre estes métodos, a técnica de nanoprecipitação proposta por Fessi e colaboradores (1989), tem sido amplamente estudada, pois apresenta uma série de vantagens como a simplicidade, eficiência e reprodutibilidade em formar pequenas partículas com elevada capacidade de encapsulação, principalmente para compostos lipofílicos. Além disso, não apresenta os inconvenientes da presença de monômeros e oligômeros residuais, consequência da polimerização *in situ* e a possibilidade de reação cruzada entre o monômero acrílico e a substância ativa. O processo de nanoprecipitação consiste de uma reformulação do processo de emulsificação espontânea para a obtenção de nanoesferas. O polímero é dissolvido em um solvente orgânico juntamente com o óleo, o tensoativo lipofílico e a substância a encapsular. A fase oleosa é vertida sobre a fase aquosa, a qual é composta de água e tensoativo hidrofílico (Figura 5). Esta mistura origina espontaneamente as nanocápsulas com diâmetro médio entre 200 a 500 nm (FESSI et al., 1989).

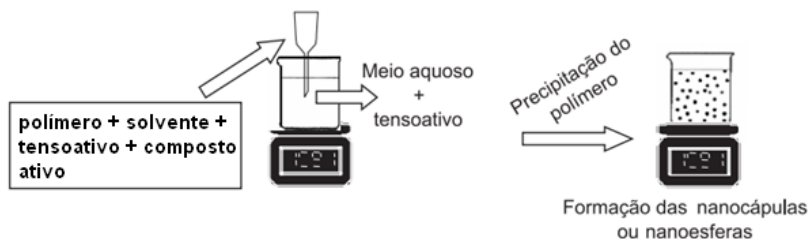


Figura 5: Método da precipitação de polímeros pré-formados.

Fonte: Schaffazick et al. (2003).

A nanoprecipitação parece ser um processo bastante simples, no entanto, seu mecanismo não está completamente esclarecido, podendo envolver um fenômeno hidrodinâmico interfacial complexo. Este processo consiste em dissolver o polímero em um solvente orgânico que é miscível com a água (por ex.: acetona ou etanol). Na fase orgânica também são adicionados o composto insolúvel ou pouco solúvel em água, o óleo e um estabilizante lipofílico. A fase orgânica é, então,

adicionada a fase aquosa contendo um tensoativo hidrofílico sob agitação magnética moderada (MONTASSER, 2000). A mistura torna-se imediatamente leitosa e as nanocápsulas são formadas instantaneamente devido à rápida difusão do solvente orgânico na fase aquosa, que leva a formação de nanogotículas de óleo contendo a substância ativa, onde o polímero insolúvel é depositado, formando uma parede polimérica. Após, a acetona é removida sob pressão reduzida e a suspensão coloidal é concentrada até o volume final desejado. A origem do mecanismo de formação de nanocápsulas pode ser explicada em termos da turbulência interfacial ou agitação espontânea da interface entre as duas fases líquidas em desequilíbrio, envolvendo fluxo, difusão e processos de superfície. Assim, a rápida difusão da acetona da fase orgânica para a fase aquosa leva à formação de nanogotículas de óleo, como resultado da tensão interfacial diminuída, e à migração do polímero insolúvel para a interface óleo-água onde é depositado, formando uma parede polimérica (FESSI et al., 1989; QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998).

Para a obtenção de nanocápsulas através do método da nanoprecipitação de um polímero pré-formado, as matérias-primas imprescindíveis são o polímero biodegradável, componente oleoso e tensoativos. Os polímeros mais utilizados são o poli [(±)-ácido láctico], o Eudragit (polimetacrilato), a poli (ϵ -caprolactona) (PCL) ou etilcelulose (FESSI et al., 1989).

O componente oleoso também é de extrema importância já que é nele que ocorrerá a solubilização da substância que se pretende encapsular, sendo a lipossolubilidade da substância ativa neste meio fator importante para a encapsulação. Os óleos mais usados são os ésteres etílicos de ácidos graxos iodados e misturas de triglicerídeos de ácidos graxos saturados de cadeia longa (FESSI et al., 1989).

Estas formulações requerem também o uso de uma associação de tensoativos, um de elevado EHL e outro de baixo EHL. A presença dos tensoativos confere maior viscosidade ao sistema após a evaporação do solvente, aumentando a estabilidade do mesmo por prevenir a coacervação e a agregação com o passar do tempo. Levando isto em consideração, pode-se destacar que o alto peso molecular dos tensoativos previne de forma efetiva a coacervação do sistema, provocada pela viscosidade da solução aquosa, além disso, eles podem ser facilmente adsorvidos em torno das nanogotículas (GUTERRES, 1995).

4.1 Propriedades físico-químicas de sistemas nanoparticulados

As microscopias eletrônicas de varredura (MEV) ou de transmissão (MET) têm sido muito empregadas na obtenção de informações relativas à forma e ao tamanho das nanopartículas. A MET pode permitir também a diferenciação entre nanocápsulas e nanoesferas, possibilitando, inclusive, a determinação da espessura da parede das nanocápsulas. A técnica de criofratura também tem sido empregada para auxiliar a análise morfológica destes sistemas (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Em estudo realizado por Santos-Magalhães et al. (2000), através de MEV, foi verificada a presença de uma segunda população de partículas, com cerca de 2 μm de diâmetro, em uma suspensão de nanocápsulas de PLGA, após 3 meses da preparação, a qual apresentava diâmetro inicial de 180 ± 52 nm. Gouvender et al. (2000), através de MET, mostraram que a incorporação de quantidades baixas ou elevadas de fármaco não alterou a morfologia de nanopartículas formadas por PLA-bloco-poli(óxido de etileno).

De uma forma geral, as nanopartículas obtidas através de diferentes métodos, após a preparação, apresentam uma distribuição unimodal, com um baixo índice de polidispersão. Os métodos usuais para a determinação da distribuição de tamanho das nanopartículas consistem em espectroscopia de correlação de fótons e MEV ou MET (SCHAFFAZICK et al., 2003).

No caso das nanocápsulas, um fator importante, que influencia o diâmetro das partículas, é a natureza do óleo utilizado como núcleo. Os resultados são atribuídos às diferenças de viscosidade, hidrofobicidade ou tensão interfacial das substâncias empregadas (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Outra observação relevante é que a adição de monômero à emulsão (método de polimerização interfacial) ou, ainda, a presença do polímero (método de deposição de polímero pré-formado) podem conduzir à diminuição de tamanho de partícula em relação à emulsão devido, provavelmente, à redução da energia livre interfacial do sistema, no primeiro caso, ou mediante um efeito estabilizador do polímero ao redor das gotículas, no segundo (SCHAFFAZICK et al., 2003).

É importante mencionar que a tendência à agregação e sedimentação das nanopartículas dispersas, em função do tempo, pode ser monitorada pela determinação de mudanças na distribuição de tamanho de partículas (GUTERRES et al., 1995).

5 Policaprolactona

A policaprolactona (PCL) foi um dos primeiros polímeros a ser sintetizado pelo grupo Carothers em 1930. A PCL é preparada pela polimerização da abertura do anel do monômero cíclico ϵ -caprolactona (Figura 6). Catalisadores como o octoato estano são usados para catalisar a polimerização e alcoóis de baixa massa molecular podem ser usados para controlar a massa molecular do polímero (OKADA, 2002). Há vários mecanismos que afetam a polimerização do PCL e estes são aniônicos, catiônicos, coordenação e radical. Cada método afeta a massa molecular resultante, a distribuição da massa molecular, a composição do grupo terminal e a estrutura química do copolímero (PITT, 1994).

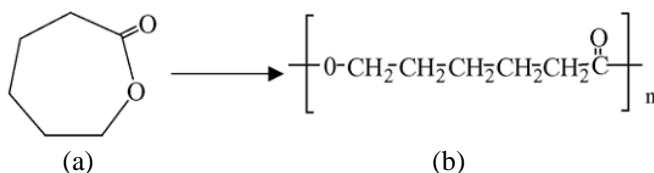


Figura 6: Polimerização do monômero cíclico ϵ -caprolactona (a) e estrutura química da poli(ϵ -caprolactona).

Fonte: Park e Kim (2005).

A PCL é um polímero semi-cristalino que possui temperatura de transição vítrea (T_g) de -60°C e ponto de fusão que varia entre 59 e 64°C . Em geral, a massa molecular média de amostras de PCL pode variar de 3.000 a 80.000 g/mol (CHANDRA; RUSTGI, 1998).

É solúvel em clorofórmio, diclorometano, tetracloreto de carbono, benzeno, tolueno, ciclohexanona e 2-nitropropano em temperatura ambiente. A PCL possui uma baixa solubilidade em acetona, acetato de etila 2-butanona, dimetilformamida e acetonitrila, e é insolúvel em álcool, éter de petróleo e éter etílico. PCL pode ser misturada com outros polímeros para melhorar a resistência e adesão, e também utilizada em combinação com polímeros, como acetato de celulose, ácido polilático e ácido-co-glicólico polilático para manipular a taxa de liberação de substâncias ativas a partir de microcápsulas (CHANDRA; RUSTGI, 1998).

Byun e colaboradores (2011) prepararam nanopartículas de PCL encapsulando α -tocoferol por emulsão O/A utilizando a técnica da ultrasonificação. Foi demonstrado que as concentrações da PCL, do

solvente na fase orgânica e o tempo de ultrasonificação afetaram significativamente a eficiência de encapsulação. No entanto, o solvente da fase orgânica e o tempo de ultrasonificação não afetaram significativamente o teor de α -tocoferol encapsulado, e a concentração de PCL não alterou significativamente o tamanho da partícula. Em geral, 5g/100 mL de PCL em diclorometano como solvente na fase orgânica com 3 minutos de ultrasonificação mostrou uma boa eficiência de encapsulação, partículas com tamanhos menores com boa polidispersibilidade e alto teor de α -tocoferol encapsulado. Devido a esses resultados, esta formulação tem sido escolhida para futuras pesquisas (BYUN et al., 2011).

6 Biofilmes

Segundo Krochta e De Mulder-Johnston (1997) filme comestível é definido como fina camada de material comestível, formado diretamente como revestimento, ou como revestimento pré-formado e colocado sobre o alimento ou entre seus componentes. Esses biofilmes agem como barreiras a elementos externos e, consequentemente, podem proteger os produtos e aumentar a sua vida útil. Algumas possíveis propriedades funcionais dos filmes incluem: retardar a migração de umidade, o transporte de gases (O_2 , CO_2), a migração de óleos e gorduras, oferecer uma integridade estrutural adicional aos alimentos, podendo também reter compostos aromáticos e carregar aditivos alimentícios ou componentes com atividade antibacteriana ou antifúngica, com liberação controlada sobre o produto onde foi aplicado (SOBRAL, 2000).

Alguns polissacarídeos, tais como alginato, pectina, carragenana, amido, amido hidrolisado e derivados da celulose têm sido estudados, para seu uso potencial como revestimentos comestíveis. No entanto, espera-se mínima propriedade de barreira contra umidade nestes filmes, devido a sua natureza hidrofílica (KESTER; FENNEMA, 1986).

6.1 Metilcelulose

A celulose é o mais abundante, renovável e biodegradável polissacarídeo encontrado na natureza. A celulose é uma macromolécula linear constituída por ligações (1-4) de monômeros β -D-glicopiranosil, e esta configuração β -(1-4) contribui para a sua estrutura rígida e para a formação de agregados através de ligações de hidrogênio intra ou inter-

molecular por meio de grupos hidroxila. Mesmo tratando-se de um polímero hidrofílico, a celulose é insolúvel em água devido ao denso arranjo de suas cadeias. Tal empacotamento se deve às fortes interações intramoleculares que ocorrem por meio de ligações de hidrogênio, levando à formação de regiões cristalinas altamente organizadas (FUNAMI et al., 2007; AOUADA et al., 2009). A substituição de grupos hidroxila na estrutura da celulose por alguns grupos funcionais fornece uma celulose hidrossolúvel através da diminuição da cristalinidade da molécula (FUNAMI et al., 2007). O número médio de hidroxilas que são substituídas em um determinado produto é conhecido como grau de substituição (GS). Todos os importantes derivados da celulose são produtos da reação de um ou mais dos três grupos hidroxilas, que estão presentes em cada unidade glicopiranosídica (CHANDRA; RUSTGI, 1998).

Estas alterações também tornam incomum o comportamento térmico da celulose em uma solução aquosa: a viscosidade diminui com temperatura abaixo do ponto crítico, mas aumenta acima do ponto crítico, às vezes, resultando na formação de géis termorreversíveis. Estas modificações aumentam a flexibilidade molecular da celulose, através da redução das ligações de hidrogênio intramoleculares, permitindo a facilidade das associações moleculares ou gelificação (SEKIGUCHI et al., 2003). O grau de substituição (GS) deve ser acima de 1,5 para que as associações moleculares ocorram (FUNAMI et al., 2007).

Os derivados representativos da celulose incluem a metilcelulose, carboximetilcelulose, hidroxipropilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, com diversas aplicações práticas nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (FUNAMI et al., 2007).

A metilcelulose (Figura 7) é um derivado da celulose que pode ser preparado a partir de um simples tratamento alcalino, com solução de hidróxido de sódio seguido de uma reação com cloreto de metila (FILHO et al., 2007; AOUADA et al., 2009). Através dessas reações pode-se substituir uma fração de grupamentos hidroxilas por grupamentos metilas. Essa substituição diminui as interações intramoleculares e o empacotamento das cadeias. O principal produto desse tratamento é a metilcelulose (MC). Os grupamentos metilas presentes na estrutura da MC dificultam um arranjo mais ordenado das cadeias, provocando mudanças significativas nas propriedades físico-químicas em relação à celulose. Por exemplo, a metilcelulose apresenta

grande solubilidade em água, enquanto que a celulose é insolúvel em água devido à sua cristalinidade (AOUADA et al., 2009).

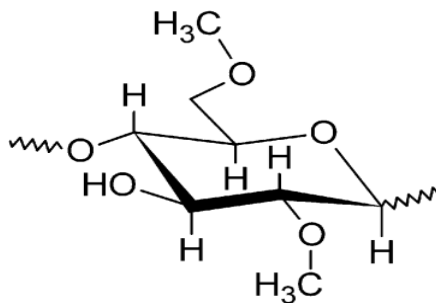


Figura 7: Estrutura química da metilcelulose.

Fonte: Tomsic et al. (2008).

A gelificação da metilcelulose depende não somente da massa molecular mas também da substituição padrão do derivado da celulose. Soluções aquosas de metilcelulose sofrem gelificação térmica na faixa de temperatura de 50 a 70° C (SONG et al., 2010).

A metilcelulose tem sido utilizada por vários anos nas indústrias farmacêutica e alimentícia como emulsificante, estabilizador coloidal ou agente de viscosidade, principalmente por ser considerada não-tóxica (YE et al., 2005). Vários produtos de importância comercial considerável podem ser desenvolvidos a partir de metilcelulose. Como exemplos, a metilcelulose pode ser utilizada como espessante na indústria alimentícia, como matriz para liberação controlada de fármacos na indústria farmacêutica, como aditivo para concreto na construção civil, e como um agente de modificação de viscosidade da água na indústria petroquímica (FILHO et al., 2007). Recentemente a metilcelulose tem sido utilizada para produzir filmes biodegradáveis (SONG et al., 2010). A aplicação da metilcelulose depende não somente da sua massa molecular ou viscosidade em água, mas também do seu grau de substituição (GS). A metilcelulose com um GS entre 1,3 e 2,6, que pode ser solúvel em água fria, possui uma maior produção e muitas outras aplicações (YE et al., 2005).

Metilcelulose (MC) apresenta habilidade para formar revestimentos gelatinosos sob indução térmica. Devido a esta característica e a resistência a gorduras e óleos, MC tem sido utilizada como revestimentos para diminuir a absorção de óleo durante a fritura

de extrudados, batatas fritas congeladas e anéis de cebola (KESTER; FENNEMA, 1986).

Em um estudo realizado por Nelson e Fennema (1991) foi avaliada a utilização de filme de metilcelulose na prevenção da migração de lipídios em produtos de confeitaria. Foi encontrada uma resposta positiva proporcional ao aumento da espessura do filme. No entanto, é necessário desenvolver uma espessura que seja ao mesmo tempo eficiente contra o transporte lipídico e minimamente percebido pelo paladar humano.

6.2 Propriedades físico-químicas dos filmes

6.2.1 *Propriedades mecânicas*

Dentre as propriedades mecânicas dos filmes, têm particular importância as que estão relacionadas à resistência, à força de cisalhamento, expressa pela força e deformação na ruptura do filme em diversas condições ambientais, tais como umidade relativa do ambiente e temperatura de acondicionamento dos mesmos (YANG; PAULSON, 2000).

O estiramento de um material é dependente da tensão aplicada sobre este corpo, que é a força F aplicada por unidade seccional de área A . Esta deformação pode ser elástica ou plástica. Materiais elásticos retornarão à sua forma original desde que a força seja removida, enquanto que materiais plásticos não retornam à sua forma original. O estiramento na tensão é chamado de tensão de estiramento (σ) e sua unidade mais utilizada N/m^2 (MARTIN, 1993).

A proporção entre a tensão e a deformação é o módulo da elasticidade ou módulo de Young (E), conforme a Equação 1, onde σ é a tensão aplicada e ε é a deformação

$$\sigma = E \varepsilon \quad (\text{Equação 1})$$

O módulo de elasticidade informa a respeito da dureza ou resistência que um material apresenta à deformação plástica. Quanto maior o módulo, mais resistente à deformação é o material (CALLISTER, 1997).

6.2.2 Propriedades ópticas

A transparência dos filmes, geralmente é um critério auxiliar para julgar a miscibilidade de dois ou mais polímeros que estão misturados na blenda polimérica (LI et al., 2006). A opacidade é o espalhamento de luz em uma amostra, responsável pela redução no contraste de objetos vistos através desta amostra e corresponde ao percentual de luz transmitida que é espalhado em uma direção que desvia mais do que um ângulo especificado comparado à luz incidente, podendo ser dividida em opacidade interna e externa. A interna é consequência do espalhamento de luz em regiões de diferentes índices de refração, devido a diferentes arranjos morfológicos e graus de cristalinidade. A opacidade externa ocorre devido a irregularidades da superfície. Essa rugosidade é afetada pelas propriedades reológicas do polímero, tipo de cristalização e superfície com a qual o fundido irá se solidificar. Sabe-se ainda que a opacidade externa é a que mais contribui para a opacidade total (PEACOOK, 2000).

6.2.3 Análise colorimétrica

Para a determinação da cor para biofilmes, geralmente é utilizado o sistema CIELab, que permite a especificação de percepções de cores em termos de um espaço tridimensional. A axial L^* é conhecida como luminosidade e varia de preto (0) a branco (100), a^* varia do verde (-60) ao vermelho (+60) e b^* varia do azul (-60) ao amarelo (+60) (GENNADIOS et al., 1996).

6.2.4 Propriedades estruturais

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) permite alcançar aumentos muito superiores ao da microscopia óptica, possibilitando a visualização de possíveis imperfeições, porosidades, separação dos componentes dos filmes em camadas, estrutura da superfície e da seção transversal. Além disso, a MEV produz imagens a partir de um feixe de elétrons que varre a superfície de uma amostra, isto é, uma imagem é produzida por feixes de elétrons que são refletidos na superfície da amostra a ser analisada (CALLISTER, 1997).

A MEV não pode ser aplicada diretamente em compostos orgânicos, pois os feixes de elétrons ao serem irradiados no ponto de contato, acabam destruindo a amostra. Desta forma, os compostos

orgânicos têm que ser previamente protegidos por uma camada condutora de ouro, carbono, níquel, etc. (KANIS, 2005).

Por meio da MEV pode-se avaliar a presença de diferentes fases na matriz em estudo ou, quando presentes, a formação de poros nos filmes poliméricos, fatores diretamente relacionados com a cinética de liberação (KANIS, 2005).

6.2.5 Cinéticas de liberação de composto ativo

A etapa de liberação da substância ativa a partir de sistemas de matrizes hidrofílicas resulta da interação complexa entre a dissolução, a difusão e os mecanismos de erosão. Em geral, as equações que descrevem o perfil de liberação de um composto ativo são associadas à forma física (cilindro, esferas, filmes, gel, etc.) do sistema de liberação, ao modo de difusão (estático ou dinâmico) e às características da matriz polimérica (porosa ou densa) (KÁLIA, 2001)

Entre as várias equações descritas, pode-se destacar as que descrevem um mecanismo de liberação por difusão Fickiana; transporte não Fickiano ou transporte anômalo e transporte do tipo II (ordem zero). O modelo matemático mais conhecido para descrever a liberação de um composto ativo a partir de uma matriz polimérica é o descrito por Higuchi. A equação simplificada (Equação 2) é a forma mais conhecida do modelo de Higuchi, onde: M_t é a quantidade absoluta do composto ativo liberado por área no tempo t , e K é uma constante (HIGUCHI, 1961).

$$\frac{M_t}{M_o} = K t^{1/2}$$

(Equação 2)

6.3 Sistemas de liberação controlada

Sistemas de liberação controlada são aqueles em que os compostos químicos são incorporados em alguns tipos de materiais, principalmente materiais poliméricos, e têm uma taxa de liberação controlada durante um determinado período de tempo (CHANDRA; RUSTGI, 1998).

Essa tecnologia sofreu incremento notório nas últimas décadas na tentativa de maximizar as vantagens inerentes às formas de liberação

controlada. Entre estes sistemas estão incluídos os lipossomas, as bombas osmóticas, os sistemas matriciais poliméricos, entre outros (LOPES et al., 2005).

A classificação dos sistemas matriciais leva em consideração diversos critérios, especificamente a estrutura da matriz, a cinética de liberação (idealmente de ordem zero), os mecanismos para controlar a liberação (erosão, difusão, intumescimento), a natureza química e as propriedades dos materiais utilizados. A erosão, a difusão e o intumescimento das matrizes são os vários mecanismos pelos quais os sistemas matriciais podem controlar a liberação das substâncias ativas. A predominância de um destes mecanismos depende invariavelmente das propriedades do polímero empregado no sistema. De um modo geral, quando as estruturas matriciais entram em contacto com o meio de dissolução podem manter a sua estrutura mais ou menos constante ao longo de todo o processo de dissolução ou podem sofrer um fenómeno de intumescimento (“swelling”) e, posteriormente, de erosão (LOPES et al., 2005).

Os polímeros controlam a taxa de liberação, a mobilidade, e o período de efetividade da substância ativa. A principal vantagem de formulações de liberação controlada é que menos substâncias químicas são necessárias para um determinado período de tempo (CHANDRA; RUSTGI, 1998).

Existem duas formas de incorporar princípios ativos nos sistemas poliméricos de liberação controlada, na primeira, o princípio ativo é misturado aos polímeros no processo de fabricação do filme, de esferas, de microesferas e de hidrogéis, mantendo-o preso dentro da matriz. Na segunda, o material reticulado é intumescido em uma solução que contém o princípio ativo até atingir o equilíbrio de massa. O material intumescido com o princípio ativo é seco para a eliminação do solvente e o sistema de liberação controlada é obtido (CHANDRA; RUSTGI, 1998).

Atualmente vários são os polímeros utilizados nesta área, destacando-se os polímeros naturais, tais como os derivados de polissacarídeos (celulose, amido); polímeros sintéticos, como poli(etileno glicol), policaprolactonas, entre outros (ANSEL; POPOVICH, 2000).

7 Embalagens ativas

Ao longo do tempo, a indústria de alimentos tem sofrido constantes mudanças para se adaptar às crescentes exigências dos consumidores. A demanda por produtos minimamente processados, sensorialmente similares aos alimentos *in natura*, tem imposto novos requerimentos às embalagens, que devem assegurar uma vida de prateleira adequada aos produtos (AZEREDO et al., 2000).

Os materiais de embalagens tradicionais têm sido selecionados no sentido de ter mínima interação com o alimento que acondicionam, constituindo assim barreiras inertes. Entretanto, nas últimas décadas, diversos sistemas de embalagem têm sido desenvolvidos com o objetivo de interagir de forma desejável com o alimento. Essas são conhecidas como embalagens ativas, geralmente planejadas para corrigir deficiências das embalagens passivas (ROONEY, 1995).

Uma embalagem ativa é aquela que, além de proteger, interage de maneira intencional com o alimento, visando melhorar algumas de suas características e, em alguns casos, responde realmente a mudanças (GONTARD, 1995; SOARES, 1998).

Rooney (1995) define embalagem ativa como aquela que exerce algum outro papel na preservação de alimentos que não apenas o de promover uma barreira inerte a influências externas.

Diferentemente das embalagens passivas, que são limitadas a proteger os alimentos de condições externas, as embalagens ativas têm várias funções adicionais, com o intuito de alterar as condições do produto, aumentando sua vida de prateleira, segurança e qualidade e, ou melhorando suas características sensoriais (VERMEIREN et al., 2002).

No sentido convencional, uma embalagem aumenta a segurança do alimento de acordo com os seguintes mecanismos: barreiras a contaminações (microbiológicas e químicas) e retenção de migração de seus próprios componentes para o alimento. Já os sistemas de embalagem ativa devem acumular funções adicionais, entre as quais podem ser destacadas: (a) absorção de compostos que favorecem a deterioração, (b) liberação de compostos que aumentam a vida de prateleira, e (c) monitoramento da vida de prateleira (AZEREDO et al., 2000).

Alguns sistemas de embalagens ativas já foram desenvolvidos e encontram aplicação em produtos disponíveis no mercado. O conceito de embalagens ativas está sendo aplicado com sucesso nos EUA, no Japão e na Austrália. Na Europa, o desenvolvimento e a aplicação desse

tipo de embalagem são ainda limitados, devido às restrições de legislação, resistência do consumidor, necessidade de conhecimento sobre a efetividade aos impactos econômico e ambiental (VERMEIREN et al., 1999). No Brasil, o desenvolvimento envolvendo embalagens ativas ainda está em nível laboratorial, e alguns centros de pesquisa vêm desenvolvendo vários projetos na área (SOARES et al., 2009).

As principais técnicas em embalagens ativas dizem respeito a substâncias que absorvem oxigênio, etileno, umidade e odor, e aquelas que emitem dióxido de carbono, agentes antimicrobianos, antioxidantes e aromas (VERMEIREN et al., 1999). Essas técnicas consistem na incorporação, ou imobilização de certos aditivos à embalagem em vez da incorporação direta no produto (KERRY et al., 2006).

7.1 Embalagens antioxidantes

A oxidação é geralmente considerada como o principal fator no desenvolvimento da rancidez de óleos e gorduras, constituindo um dos mecanismos mais frequentes de deterioração e redução da vida útil dos alimentos (VERMEIREN et al., 1999). Além de alterar o sabor (rancificação) e a qualidade nutritiva (perda de vitaminas e ácidos graxos essenciais) dos alimentos, a oxidação resulta em compostos reativos e tóxicos que representam um perigo e tornam-se inaceitáveis para os consumidores (LAGUERRE et al., 2007).

A taxa de oxidação lipídica pode ser acelerada por vários fatores, como a alta temperatura, luz e catálise por presença de metais em quantidades traço. Por outro lado, é inibida por baixas temperaturas, exclusão do oxigênio e pela presença de antioxidantes. Os antioxidantes são amplamente utilizados como aditivos em alimentos para melhorar a estabilidade à oxidação lipídica e prolongar a sua vida útil (VERMEIREN et al., 2002).

As embalagens ativas antioxidantes são uma das tecnologias mais promissoras para preservar alimentos sensíveis à oxidação (LEE, 2005). Essa tecnologia já vem sendo utilizada pela indústria de cereais dos EUA para preservar cereais matinais, produtos nos quais o desenvolvimento de rancidez limita a vida de prateleira (LABUZA; BREENE, 1989). Esses sistemas consistem na incorporação de substâncias antioxidantes em filmes plásticos, papéis ou sachês, de onde serão liberadas para proteger os alimentos da degradação oxidativa, inibindo as reações de oxidação ao reagirem com radicais livres e peróxidos e, conseqüentemente, estendendo a vida de prateleira

(VERMEIREN et al., 1999; LEE et al., 2004; TOVAR et al., 2005; MIN; KROCHTA, 2007).

Embora as embalagens antioxidantes apresentem potencial para aplicações comerciais, é necessário que elas satisfaçam critérios de segurança alimentar, pois a difusão dos antioxidantes para os alimentos deve ser controlada (VERMEIREN et al., 1999). Por esse motivo, há uma crescente preferência pelo uso de substâncias naturais, incluindo os compostos fenólicos (α -tocoferol e flavonóides), ácidos orgânicos (ácido ascórbico), extrato de plantas (alecrim, chá, etc.) e poliaminas (espermina e espermidina). As substâncias naturais são normalmente caras, logo o desenvolvimento de novas embalagens ativas empregando quantidades mínimas destes compostos é desejável para aplicações práticas (YANISHLIEVA-MASLAROVA, 2001; SOARES, 2009).

Muitas pesquisas sobre a aplicação de embalagens ativas antioxidantes e o seu efeito sobre a oxidação em alimentos estão disponíveis na literatura. Lee et al. (2004) produziram um revestimento incorporado com α -tocoferol, aplicado sobre papel, para utilização como embalagem antioxidante. Os filmes foram testados em uma emulsão modelo e em creme de leite, tendo apresentado resultados positivos na inibição da oxidação lipídica e, portanto, propriedades antioxidantes satisfatórias.

Herald et al. (1996) avaliaram o grau de oxidação lipídica de peru cozido embalado em filmes a base de proteína de milho incorporados com butil hidroxianisol (BHA), tendo reportado menores teores deste produto secundário da oxidação nas amostras acondicionadas em presença do antioxidante.

Wessling et al. (2000) avaliaram a habilidade antioxidante de filmes de polietileno de baixa densidade (PEBD), impregnados com BHT e α -tocoferol em embalagens para cereais de aveia. Variações no perfil de voláteis durante a estocagem do produto indicaram que os filmes impregnados com BHT possibilitaram as menores alterações ao longo de 10 dias de estocagem.

Huang e Weng (1998) prepararam filmes de PEBD, incorporados com butilhidroxitolueno (BHT), os quais foram avaliados quanto à sua capacidade em inibir a peroxidação lipídica em filés e óleo de peixe em contato com eles. O filme de PEBD incorporado com BHT foi capaz de inibir a oxidação lipídica tanto no filé quanto no óleo.

Salmieri e Lacroix (2006) desenvolveram filmes à base de alginato e poli(ϵ -caprolactona) incorporados com óleos essenciais de orégano, semente e canela e avaliaram as suas propriedades

antioxidantes. Os resultados mostraram que os filmes a base de orégano exibiram as maiores propriedades antioxidantes.

Nerín et al. (2006) desenvolveram embalagens ativas, que consistiram de filmes de polipropileno (PP) imobilizados com extrato natural de alecrim e testaram as suas propriedades antioxidantes em mioglobina pura e bifes de carne bovina fresca. Os filmes aumentaram a estabilidade tanto da mioglobina quanto dos bifes contra processos oxidativos, sendo uma maneira promissora de estender a vida de prateleira da carne fresca. O mesmo grupo testou filmes de PP imobilizados com várias substâncias derivadas do alecrim contra compostos oxidáveis como ácido ascórbico, ferro (II) e ácidos graxos, demonstrando a eficácia desses modelos (NERÍN et al., 2006).

CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS DE PCL CONTENDO α -TOCOFEROL

Introdução

A oxidação lipídica é uma reação iniciada por radical livre que leva a perdas da vida de prateleira, palatabilidade, funcionalidade e qualidade nutricional dos óleos, gorduras e alimentos que contém lipídios insaturados. Além disso, há um crescente interesse na oxidação lipídica no estado de saúde, pois acredita-se que esta reação desempenha importante papel etiológico nas doenças cardiovasculares, aterosclerose, câncer, processo de envelhecimento e muitas outras. Portanto, a ingestão de alimentos contendo lipídios oxidados é preocupante já que os produtos da oxidação lipídica podem promover a oxidação *in vivo* (FRANKEL, 1996; REISCHE et al., 2002).

Para retardar ou prevenir a deterioração oxidativa, os antioxidantes são adicionados nos alimentos com a finalidade de manter a qualidade e estender a vida de prateleira dos produtos alimentícios. Os antioxidantes podem ser de origem natural ou sintética. A utilização de antioxidantes sintéticos é restrita em diversos países por causa de seus possíveis efeitos indesejáveis à saúde (HILST, 1999; SUJA et al. 2004). Sendo assim, o uso de antioxidantes naturais na indústria de alimentos tem aumentado significativamente e muitos compostos têm sido testados em sua eficácia como antioxidantes, principalmente os tocoferóis (NOGALA-KALUCKA et al., 2005; ISNARDY et al., 2003).

O α -tocoferol é o antioxidante lipossolúvel mais representativo, e é a forma mais biologicamente ativa dos componentes da vitamina E que tem sido utilizado como aditivo em alimentos. No entanto, a utilização de seus efeitos benéficos é limitada, pois esse componente é lábil ao aquecimento e ao oxigênio (BARRERA-ARELLANO et al., 1999). Esses impedimentos para a aplicação do α -tocoferol podem ser contornados aplicando-se as tecnologias da nanoencapsulação a fim de protegê-lo de um ambiente desfavorável (YOO et al., 2006).

Portanto, neste capítulo é relatado o desenvolvimento e otimização de formulações de nanocápsulas poliméricas contendo α -tocoferol, através da técnica da nanoprecipitação. Para isto, foi utilizada a metodologia superfície de resposta, a fim de se obter a formulação de nanocápsulas com a melhor eficiência de encapsulação, o menor tamanho de partícula e com baixo índice de polidispersão, empregando-se diferentes concentrações de α -tocoferol e surfactantes. Além disso, foram avaliadas a estabilidade das suspensões de nanocápsulas, através do potencial zeta, bem como a morfologia das nanocápsulas por microscopia eletrônica de varredura. A formulação ótima foi utilizada

posteriormente para a incorporação nos biofilmes de metilcelulose, como mostra o capítulo seguinte.

Publicação: Optimization of α -tocopherol loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method for food applications

Artigo submetido à revista científica

Optimization of α -tocopherol loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method for food applications

Carolina Montanheiro Noronha^{1*}, Andrea Ferreira Granada², Sabrina Matos de Carvalho¹, Renata Calegari Lino¹, Pedro Luiz Manique Barreto³

1 Post graduation Program in Food Science, Federal University of Santa Catarina, Florianopolis, SC, 88040-970, Brazil

2 Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV-CNRS), 38041 Grenoble Cedex 9, France/ Post graduation

3 Department of Food Science, Federal University of Santa Catarina, Florianopolis, SC, 88040-970, Brazil

Corresponding Author: Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto

Postal address: Department of Food Science, Federal University of Santa Catarina, Florianopolis, Santa Catarina, Brazil

Phone: +55 (48) 3721-5368

e-mail: plmbarreto@gmail.com

Abstract

Poly ϵ -caprolactone (PCL) nanocapsules containing α -tocopherol were produced by a nanoprecipitation method. The Box–Behnken design was used to optimize the encapsulation efficiency (% EE), particle size (PS) and polydispersity index (PDI) using three independent variables: α -tocopherol amount (mg, X1), lecithin concentration (mg/mL, X2) and Pluronic F68 concentration (% w/v, X3). The optimal conditions for α -tocopherol encapsulation were obtained at 200 mg of α -tocopherol, 2.5 mg/mL of lecithin and 1% (w/v) of Pluronic F 68, predicting a response of 95.08 % (%EE) 187.91 nm (PS) and 0.114 (PDI), while in experimental conditions were 99.97 % (% EE), 184.6 nm (PS) and 0.112 (PDI). All formulations showed excellent stability (zeta potential < -30 mV) and high values for α -tocopherol recovery (in the range of 78.78 – 90.34 %). The TEM micrographs revealed a spherical, irregular and capsular structure. This results suggests the nanocapsule has a wide application in foods, as antioxidant food ingredients or in active packaging.

Keywords: Nanocapsules, α -Tocopherol, Poly ϵ -caprolactone (PCL), Nanoprecipitation, Response surface modeling, Box–Behnken experimental design.

1 Introduction

Nanotechnology is one of the most innovative technologies of the present century. The possible applications of this technology are immense, and it's becoming increasingly important for the food sector. Research is being carried out in the food industry to improve the quality and safety of food products, by employing nanotechnology applications. Some examples of these applications are the use of nanoparticles as bioactive compound in functional foods, leading to more nutritious, convenient, and aromatic products to consumers (FARHANG, 2007; SIEGRIST et al., 2007, SOZER; KOKINI, 2009; SEKHON, 2010). The protection of bioactive compounds, such as vitamins, antioxidants, proteins, and lipids is achieved using the different techniques of nanoencapsulation. By reducing particle size, nanotechnology can contribute to improving the properties of bioactive compounds, such as delivery properties, solubility, prolonged residence time in the gastrointestinal tract and efficient absorption through cells (SOZER; KOKINI, 2009; SEKHON, 2010).

Oils, fats, and foods containing unsaturated lipids may be affected by lipid oxidation, a degradative reaction that causes its loss of shelf life, palatability, functionality, and nutritional quality. Antioxidants are added as a natural or synthetic in foods either to delay the onset of oxidation or decrease the rate at which lipid oxidation proceeds. Due their possible toxic effects, synthetic antioxidants have been replaced by natural antioxidants (SOARES, 2002; EITENMILLER; LEE, 2004). Vitamin E compounds have been used as a food additive, since they are well recognized for their effective inhibition of lipid oxidation in foods. Among the vitamin E categories, α -tocopherol is a lipophilic, phenolic compound of plant origin that acts as free radical scavengers (EITENMILLER; LEE, 2004; HENSLEY et al., 2004; YOO et al., 2006). The high interest in α -tocopherol encapsulation is because this compound is labile to heat, light and oxygen (BARRERA-ARELLANO et al., 2002; SABLIOV et al., 2009). Moreover, the encapsulated α -tocopherol allows for better water solubility of this lipophilic compound, increasing its bioavailability (YOO et al., 2006; KHAYATA et al., 2012).

In this study, poly ϵ -caprolactone (PCL) was used as a polymer wall to entrap the α -tocopherol and produce loaded nanocapsules. Regarding the literature, PCL is a hydrophobic, semi-crystalline, non-

toxic, biodegradable and biocompatible polyester that has been used to release encapsulated drugs (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

The objective of this work was to determine the optimal conditions for α -tocopherol encapsulation by nanoprecipitation. The Box–Behnken experimental design was used to investigate the influence of the emulsifiers concentrations and α -tocopherol amount on the encapsulation efficiency, particle size and polydispersity index. Additionally, nanocapsules morphology were studied.

2 Materials and Methods

2.1 Materials

α -Tocopherol (98% purity HPLC grade) and poli ϵ -caprolactone (PCL, M_w 70,000 – 90,000) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Soybean lecithin with 70% phosphatidylcholine (LIPOID S 75) was supplied by Lipoid (Ludwigshafen, Germany) and Poloxamer (Pluronic F68) was kindly donated by the BASF Chemical Company, (EUA). Except for the methanol of HPLC grade used in the analysis (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), all others chemical reagents and solvents were analytical grade and used as received.

2.2 Preparation of PCL nanocapsule suspensions containing α -tocopherol

The PCL nanocapsule suspensions containing α -tocopherol were prepared using the nanoprecipitation method as described by Fessi et al. (1989). Firstly, 70 mg PCL was dissolved in 2.0 mL of acetone at 50°C in an ultrasonic bath. Thereafter, 10.0 mL of a lecithin solution in acetone and ethanol (60:40, v/v) were added to the acetonic solution. The resulting solution was mixed with α -tocopherol, and this organic phase was poured into an aqueous phase (25.0 mL) containing the hydrophilic surfactant (Pluronic F68) under moderate magnetic stirring, at 25 °C. The aqueous phase immediately turns milky with bluish opalescence as a result of the formation of nanocapsule suspension. The organic solvents were then eliminated by evaporation, and the final volume was adjusted to 20.0 mL. The nanocapsule suspensions were then filtered through 8 μ m pore-sized filter paper (J-Prolab, São José dos Pinhais, Brazil).

2.3 Box-Behnken design

The Box-Behnken design (BOX; BEHNKEN, 1960) was used to optimize statistically the formulation parameters and evaluate the effect of the independent variables, α -tocopherol amount (mg, X_1), lecithin concentration (w/v, X_2), and Pluronic F68 concentration (% w/v, X_3), on the encapsulation efficiency (% EE, Y_1), particle mean size (PS, nm, Y_2) and polydispersity index (PDI, Y_3). Coded and uncoded independent variables are summarized in Table 1. A three-factor, three-level design is suitable for exploration of quadratic response surfaces and for constructing second order polynomial models. The design consists of replicated center points and the set of points lying at the midpoints of each edge of the multidimensional cube that defines the region of interest, thus requiring fewer runs than a central composite design. A second-order polynomial equation is defined as Equation 1.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 \quad (1)$$

where Y represents the response associated with each factor level combination, b_0 is an intercept; b_1 , b_2 and b_3 are the linear coefficients; b_{12} , b_{13} and b_{23} are the interactive coefficients; b_{11} , b_{22} and b_{33} are the quadratic coefficients, and X_1 , X_2 and X_3 are the coded levels of independent variables. To fit the second order polynomial equation to all independent variables, experimental data was analyzed by multiple regressions, and significant differences between independent variables were arrived at by analysis of variance (ANOVA). The relationships between the responses and the independent variables were visualized by surface response and contour plots of the fitted polynomial regression equations generated using the software STATISTICA (version 7.0, 2004 StatSoft, Inc., EUA).

Table 1: Coded and uncoded variables used in the Box-Behnken design.

Uncoded variables	Coded variables	Coded levels		
		-1	0	1
α -Tocopherol concentration	X ₁	200	300	400
Lecithin concentration (mg/mL)	X ₂	1.5	2.5	3.5
Pluronic F68 concentration (% w/v)	X ₃	0.5	1.0	1.5

2.4 Particle mean size (PS), polydispersion index (PDI) and zeta potential (ζ)

The particle mean size (PS), polydispersity index (PDI) and zeta potential (ζ) of the α -tocopherol-loaded PCL nanocapsules was determined by dynamic light scattering system, using a Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). The measurements were performed in triplicate at 25 °C after appropriate dilution of the nanocapsule suspensions in Milli-Q[®] water.

2.5 α -Tocopherol content, recovery and encapsulation efficiency

The total α -tocopherol (α -TP) content in the nanocapsule suspensions was determined after complete dissolution of 1.0 mL nanocapsule suspension in 10.0 mL methanol. The mixture was sonicated 30 min to extract the α -tocopherol into the solvent. Then, solutions were centrifuged at 6200g for 30 min and the α -tocopherol content obtained into the supernatant was analyzed by HPLC (LC-20AT, Shimadzu, Tokyo, Japan). The α -tocopherol content was expressed in mg of α -tocopherol/mL of suspension. α -Tocopherol recovery (%) was estimated by comparing the total content of α -tocopherol found in the nanocapsule suspensions with the initial content added to the formulations, as shown in Equation 2.

$$\text{Recovery}(\%) = (\text{Initial } \alpha\text{-TP content} - \text{total } \alpha\text{-TP content}) / \text{initial content} \times 100 \quad (2)$$

The encapsulation efficiency (%) was determined as being the difference between the total α -tocopherol content in the nanocapsule suspensions and free α -tocopherol content obtained after separation of

loaded-nanocapsules from the aqueous medium by a suspension ultrafiltration/centrifugation procedure using Amicon Ultra Centrifugal Filters with Ultracel 30k membrane (Millipore, Ireland). Samples were centrifuged at 5600g for 30 min at 20°C. The free α -tocopherol concentration found in the supernatant was then determined by HPLC (LC-20AT, Shimadzu, Kyoto, Japan) analysis. The encapsulation efficiency was calculated, according to Khayata et al. (2012) using the Equation 3.

$$\text{Encapsulation efficiency (\%)} = (\text{Total } \alpha\text{-TP content} - \text{free } \alpha\text{-TP content}) / \text{total } \alpha\text{-TP content} \times 100 \quad (3)$$

2.5.1 Chromatographic analysis

The HPLC equipment was a Shimadzu Liquid chromatographer (Tokyo, Japan) equipped with a CBM-20A system controller, an LC-20AT pump system, an SPD-M20A photodiode array detector, a CTO-20A oven, and an SIL-20A auto sampler. The analysis was carried out using a Shim-pack CLC-ODS(M) column (250 x 4,6 mm, I.D., 5 μ m particle size) Shimadzu (Kyoto, Japan), protected by a guard cartridge system, Shim-pack CLC G-ODS (4) (12,5 x 4,6 mm, 5 μ m particle size) Shimadzu (Tokyo, Japan). The quantitative measurement of α -tocopherol content was done at $\lambda = 292$ nm with a mobile phase of methanol:water (99:1) (v/v) at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. The analytical column was kept at 50°C and the injection volume was 50 μ L. The data were stored and processed by a Workstation LC solution (Tokyo, Japan).

The linearity of the determination method was measured by injecting standard solution of different concentrations. Injections were done in triplicate at each concentration. The calibration curves of peak area versus α -tocopherol concentration (Figure 1) were linear in the concentration range of 0.2–1.0 mg/mL with a correlation coefficient R^2 of 0.9998. The regression equation of the media calibration graph (n=3) was: $y = 8.10^6x + 44542$. The α -tocopherol peak obtained is shown in Figure 2.

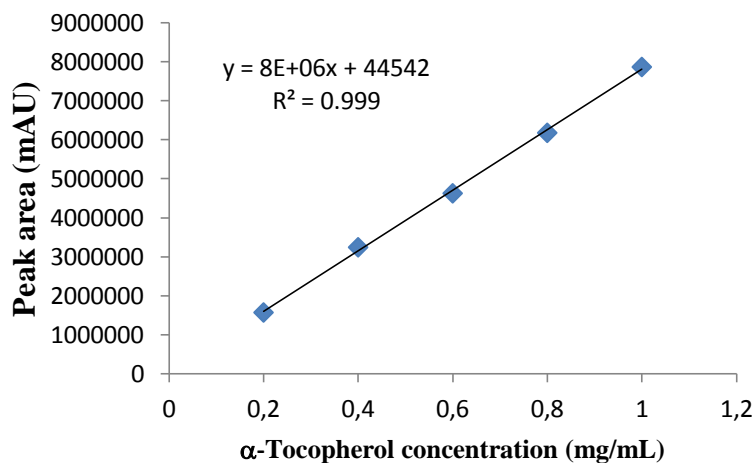


Figure 1: α -Tocopherol calibration curves obtained by HPLC and the respective regression equation.

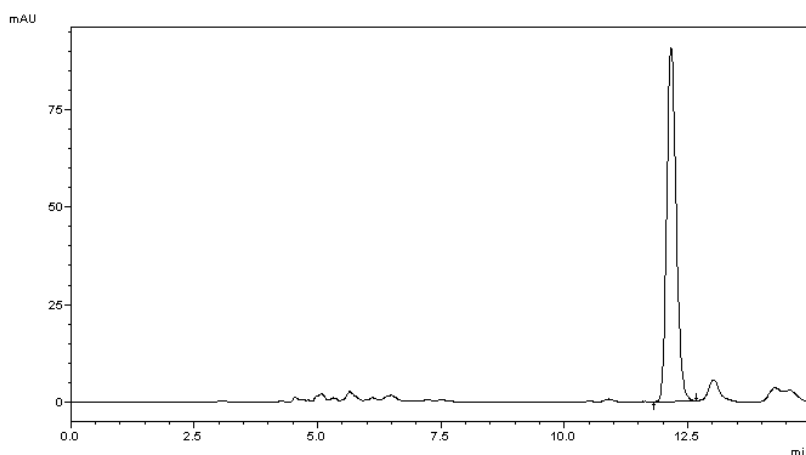


Figure 2: Chromatogram obtained for α -tocopherol standard solution.

2.6 Transmission electron microscopy

The morphology and structure of α -tocopherol loaded PCL nanocapsules were examined using a transmission electron microscope

(TEM). TEM micrographs were taken with a JEOL JEM-1011 microscope (Tokyo, Japan) operating at 80 kV acceleration. The concentrated nanocapsule suspension was first diluted in water (1/3) and directly deposited on carbon-coated 200 mesh copper grid, then observed after drying.

3 Results and discussion

3.1 Stability of nanocapsules

For all formulations, PCL nanocapsules were shown to be negatively charged, as displayed by zeta potential values (ranging from -30.6 mV to -51.1 mV). Since the stabilizer used (Pluronic F68) is a non-ionic surfactant, the negative zeta potential values can be caused by the lecithin, as an emulsifier, due to the presence of its negatively charged carboxyl groups in free fatty acids and phosphate groups in acidic phospholipids, such as phosphatidylserine, phosphatidic acid, and phosphatidylinositol (HATANAKA et al., 2010). As PCL is a hydrophobic polymer that constitutes the nanocapsule wall, the hydrocarbon chains of lecithin interact with the hydrophobic regions of the PCL wall and the emulsifier head with the aqueous phase, which results in negative surface potential (JOO et al., 2008). The stability of nanoparticulate suspensions has always been a crucial factor for making use of these suspensions (MOTWANI et al., 2008). The literature reports that zeta potential values lower than -10 mV (usually between -25 and -30 mV) assure good colloidal stability of nanoparticulate suspensions due to the high energy barrier between particles (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

3.2 Experimental design

The process optimization of α -tocopherol encapsulation was carried out using a Box–Behnken experimental design. Three variables were chosen in the response surface methodology (RSM) to optimize the encapsulation, such as: α -tocopherol concentration (X_1) (200 – 400 mg), lecithin concentration (X_2) (2.5 – 4.5 mg/mL), and Pluronic F68 concentration (X_3) (0.5 – 1.5%), and the obtained data were analyzed by STATISTICA 7.0. The experimental runs and the observed responses for the 15 formulations are shown in Table 2. The values for α -tocopherol recovery were high, in the range from 78.31 to 90.34%.

The regression coefficients, the respective p-values and the coefficients of model analysis are summarized in Table 3. Analysis of variance (ANOVA, Table 3) showed that quadratic polynomial models indicated an adequate representation of the experimental data, with regression coefficients (R^2) for the responses of % EE, PS and PDI being 0.975, 0.991 and 0.979, respectively. Mune, Minka and Mbome (2011) suggested that for a good fit of a model, R^2 should be at least 0.85. This indicates that quadratic polynomial models obtained from the experimental data were suitable to describe the influence of the independent variables, showing an excellent fit for all the analyzed variables. The significance of each coefficient was determined using the p-value in Table 3. The corresponding variables will be more significant if the absolute t-value becomes larger and the p-value becomes smaller (AMIN; ANGGORO, 2004).

Table 2: Observed values of responses for the Box-Behnken design.

Run	Coded variables			Dependent variables			Independent variables		
	X_1	X_2	X_3	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2	Y_3
				(mg)	(w/v)	(%, w/v)	EE (%)	PS (nm)	PDI
1	-1	-1	0	200	2.5	1.0	99.97	184.6 ± 1.34	0.112 ± 0.007
2	1	-1	0	400	2.5	1.0	80.00	213.6 ± 6.15	0.085 ± 0.005
3	-1	1	0	200	4.5	1.0	99.19	188.9 ± 0.21	0.091 ± 0.005
4	1	1	0	400	4.5	1.0	75.55	205.8 ± 5.16	0.113 ± 0.001
5	-1	0	-1	200	3.5	0.5	99.36	184.4 ± 0.99	0.072 ± 0.015
6	1	0	-1	400	3.5	0.5	99.26	208.4 ± 1.69	0.065 ± 0.459
7	-1	0	1	200	3.5	1.5	99.44	203.0 ± 6.29	0.106 ± 0.001
8	1	0	1	400	3.5	1.5	93.80	219.1 ± 6.50	0.068 ± 0.020
9	0	-1	-1	300	2.5	0.5	93.11	199.8 ± 0.70	0.140 ± 0.042
10	0	1	-1	300	4.5	0.5	94.88	198.1 ± 5.87	0.086 ± 0.016
11	0	-1	1	300	2.5	1.5	92.38	196.2 ± 2.69	0.116 ± 0.005
12	0	1	1	300	4.5	1.5	94.00	197.9 ± 2.54	0.102 ± 0.033
13	0	0	0	300	3.5	1.0	87.77	195.5 ± 5.80	0.084 ± 0.004
14	0	0	0	300	3.5	1.0	93.66	195.8 ± 4.81	0.099 ± 0.008
15	0	0	0	300	3.5	1.0	90.00	199.8 ± 3.82	0.088 ± 0.008

X_1 = α -tocopherol amount, X_2 = lecithin concentration and X_3 = Pluronic F68 concentration.

Results showed that the quadratic term of Pluronic F68 concentration was the variable that most strongly influenced the encapsulation efficiency (% EE). For the particle size (PS), the variable

with the largest effect on this response was the linear effect of α -tocopherol concentration (α -TP) ($P < 0.05$). The linear and quadratic terms of lecithin concentration had a significant effect on the polydispersity index (PDI) ($P < 0.05$). For all responses, the effect of the remaining terms was non-significant ($P > 0.05$), and none of the interactive terms had a significant effect ($P > 0.05$).

Table 3: Values of regression coefficients and significance of the components for the quadratic model for responses Y_1 , Y_2 and Y_3 .

Term	% EE			PS (nm)			PDI		
	Coef	t-value	p-value	Coef	t-value	p-value	Coef	t-value	p-value
b_0	90,47667	52,69711	0,000360	197,0333	142,1554	0,000049	0,090333	20,14327	0,002455
b_1	-1,43500	-0,96510	0,436320	10,0250	8,3518	0,014035	-0,011250	-2,89670	0,101377
b_{11}	1,28667	0,83139	0,493207	3,4583	2,7681	0,109489	-0,011667	-2,88614	0,102010
b_2	0,84750	0,56998	0,626183	0,0000	0,0000	1,000000	-0,017000	-4,37724	0,048431
b_{22}	-3,08583	-1,99393	0,184331	-2,2667	-1,8143	0,211306	0,021583	5,33936	0,033333
b_3	-0,40250	-0,27070	0,812001	-0,9500	-0,7914	0,511642	-0,002000	-0,51497	0,657840
b_{33}	6,20167	4,00725	0,057001	3,2333	2,5880	0,122473	-0,000917	-0,22677	0,841673
b_{12}	-0,91750	-0,61706	0,600085	-3,0250	-2,5201	0,127930	0,012250	3,15419	0,087520
b_{13}	-1,38500	-0,93147	0,449944	-1,9750	-1,6454	0,241634	-0,007750	-1,99551	0,184116
b_{23}	-0,03750	-0,02522	0,982169	0,8500	0,7081	0,552270	0,010000	2,57485	0,123504
R^2	0,97555			0,9913			0,979160		
$R^2 - \text{adj}$	0,82885			0,9390			0,854110		

b_0 = Regression coefficient, b_i = Linear coefficient, b_{ii} = Quadratics coefficients and

b_{ij} = Interaction coefficients.

%EE = Y_1 , PS = Y_2 and PDI = Y_3

Values at $p < 0.05$ were considered significant.

3.3 Response surface plotting

To visualize the effect of the independent variables on the dependent ones, dimensional response surface plots drawn for the graphical optimization of α -tocopherol encapsulation are presented in Figs. 3–5. These types of plots are useful in the study of the effects of two factors on the response at one time, when the third factor is kept at a constant level (MOTWANI et al., 2008). Since the regression model has three independent variables, one variable was held constant at the central level for each plot, thus, a total of three response 3D plots were produced for responses (KHAJEH, 2011).

3.3.1 Encapsulation efficiency (%)

As shown in Table 2, the values of the efficiency encapsulation were in the range of 75.55 to 99.97 %. Similar results have been reported by Ameller et al. (2003), Zili et al. (2005), Mazzarino et al (2010), Khayata et al. (2012), using the nanoprecipitation method. Regarding the literature, nanoprecipitation is one of the methods that gives the best results for nanocapsule encapsulation (80% or more) (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010)

Some factors, such as the physicochemical properties of the compound and its polarity, in particular, can strongly influence the encapsulation efficiency. Generally, the encapsulation efficiency increases proportionally to the lipophilicity of the compound to be encapsulated (AMELLER et al., 2003; STELLA et al., 2007). As vitamin E is oil, its encapsulation efficiency could reach 99%. These high values of % EE can be a proof that PCL has no solubility in α -tocopherol (KHAYATA et al., 2012). In this study, the encapsulation efficiency of α -tocopherol was high due to the high lipophilicity of this compound. Although the effect of variables has been statistically insignificant ($P > 0.05$), the response surface plot (Fig. 3 a, b) shows that the %EE increases when α -tocopherol concentration decreases. Khayata et al. (2012) also reported that using different amounts of vitamin E in the preparation led to no significant changes in encapsulation efficiency. Fig. 3 c reveals a curvature around the central point in the interaction between both surfactants. Minimum values of %EE are obtained mainly at the central points for Pluronic F68 concentrations. Some authors observed that encapsulation efficiencies were affected greatly by the type and content of the surfactants (ZHU et al., 2005; KHOEE; YAGHOUBIAN, 2008). Thereby, systems with good packing between the pair of surfactant, high emulsifying power and a high concentration give better encapsulation efficiency results (MORA-HUERTAS et al., 2010). The second order equation for % EE is as Equation 4.

$$\begin{aligned} \%EE = & 90.47667 - 1.43500X_1 + 0.84750X_2 - 0.40250X_3 - 0.9175X_1X_2 \\ & - 1.38500X_1X_3 - 0.03750X_2X_3 + 1.28667X_1^2 - 3.08583X_2^2 + \\ & 6.20167X_3^2 \end{aligned} \quad (4)$$

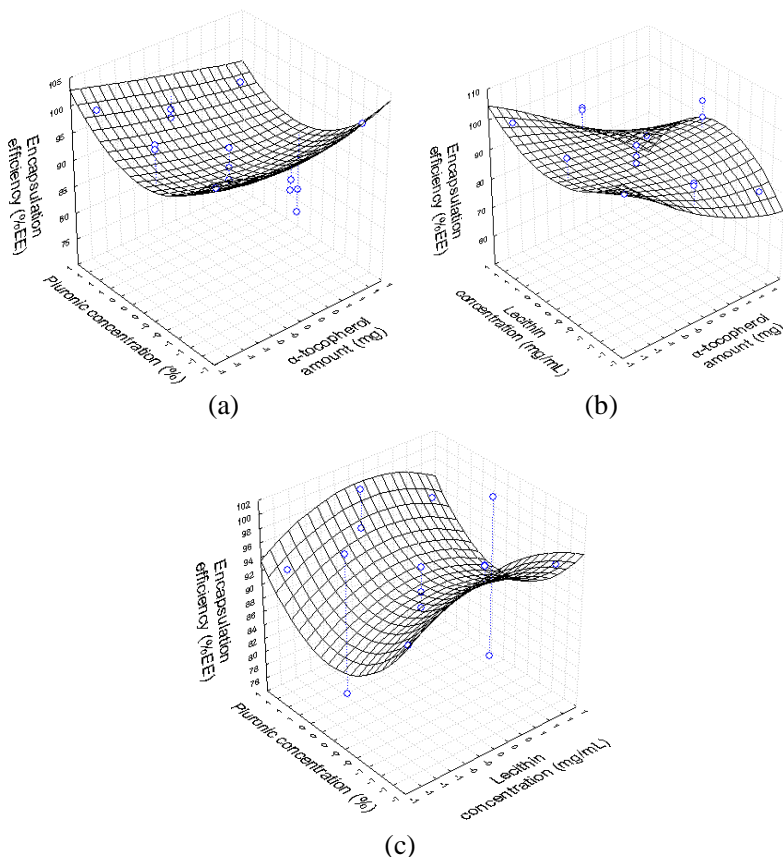


Figure 3: Response surface obtained from Box–Behnken design for encapsulation efficiency (%EE) as a function of: a) α - tocopherol amount and Pluronic F68 concentration b) α - tocopherol amount and lecithin concentration and c) Pluronic F68 and lecithin concentrations.

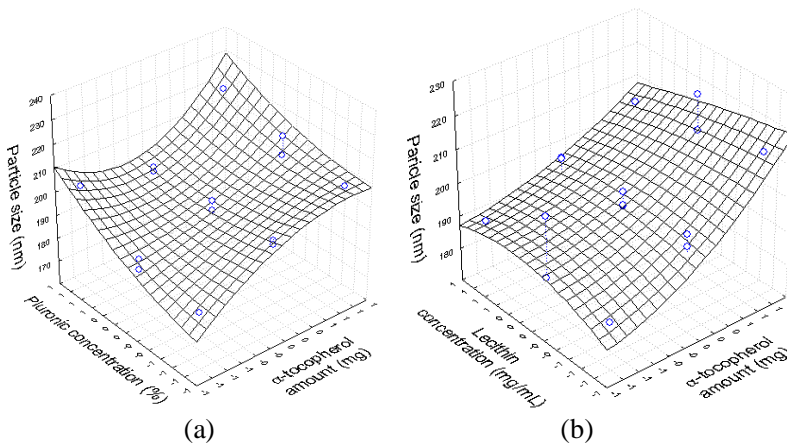
3.3.2 Particle size (PS)

The mean particle size of PCL nanocapsules obtained ranged from 184.4 to 219.1 nm (Table 2). Khayata et al. (2012) have also found that range of mean particle size of PCL nanocapsules containing vitamin E by nanoprecipitation method. However, these values of mean particle size were less than reported by Byun et al. (2011) who found values between 247 to 1070 nm of α -tocopherol loaded PCL nanoparticles by

oil-in-water emulsion solvent evaporation. In the nanoprecipitation method, some factors, such as the nature and concentration of the polymer in the organic phase, solvent polarities, the nature and ratio of internal/external phases, and the nature and concentration of surfactants are essential in the determination of nanoparticle size (SANTOS-MAGALHÃES et al., 2000; ZILLI et al., 2005). Fig. 4 a-c shows the effect of the factors of the independent variables on the response PS. In general, the particle size increased with an increase in α -tocopherol amount (Figs. 4 a, b), in agreement with Khayata et al. (2012). A decrease of Puroic F68 concentration shows a decrease in the PS, while lecithin does not seem to exert any influence (Fig. 4 a-c).

Bouchemal, Briancon and Fessi (2004) reported that the surfactant system Lipoid S75/Pluronic F68 produced the smallest particle size among all surfactant systems employed. Seijo et al. (1990) observed that the concentration of Pluronic F68 significantly affected the size of the nanoparticles obtained. The second order Equation 5 illustrates the relationship of the three variables for particle size PS.

$$PS = 197.0333 + 10.0250X_1 - 0.9500X_3 - 3.0250X_1X_2 - 1.9750X_1X_3 + 0.8500X_2X_3 + 3.4583X_1^2 - 2.2667X_2^2 + 3.2333X_3^2 \quad (5)$$



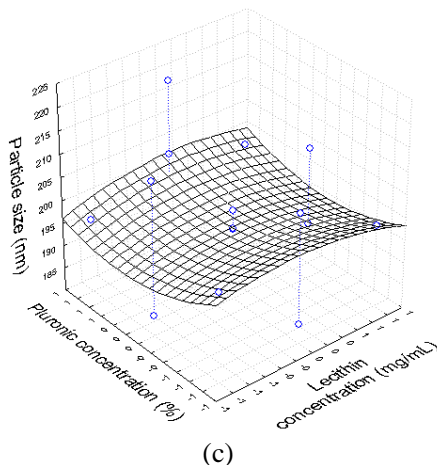


Figure 4: Response surface obtained from Box–Behnken design for particle size (PS) as a function of: a) α -tocopherol amount and Pluronic F68 concentration b) α -tocopherol amount and lecithin concentration and c) Pluronic F68 and lecithin concentrations.

3.3.3 Polydispersity index

The values for the polydispersity index (PDI) were less than 0.140 (Table 2), indicating a unimodal distribution ($PDI \leq 0.2$) (CALVO et al., 1997). Fig. 5 shows the surface plot for the PDI as a function of α -tocopherol amount, lecithin and Pluronic F68 concentrations. The linear and quadratic effects of lecithin showed affect significantly the PDI. The lowest value for PDI is obtained mainly when the regions are above the middle point for lecithin concentrations (Fig. 3 a,c). This result was consistent with the findings of Zambrano-Zaragoza et al. (2011) in the preparation of α -tocoferol loaded PCL nanocapsules using RSM. Calvo et al. (1997) also find values close to a monomodal distribution, optimizing PCL nanocapsules in a combination of lecithin and poloxamer as emulsifiers. Equation 6 is the second order model for PDI.

$$PDI = 0.090333 - 0.011250X_1 - 0.017000X_2 - 0.002000X_3 + 0.012250X_1X_2 - 0.007750X_1X_3 + 0.010000X_2X_3 - 0.011667X_1^2 - 0.021583X_2^2 + 0.000917X_3^2 \quad (6)$$

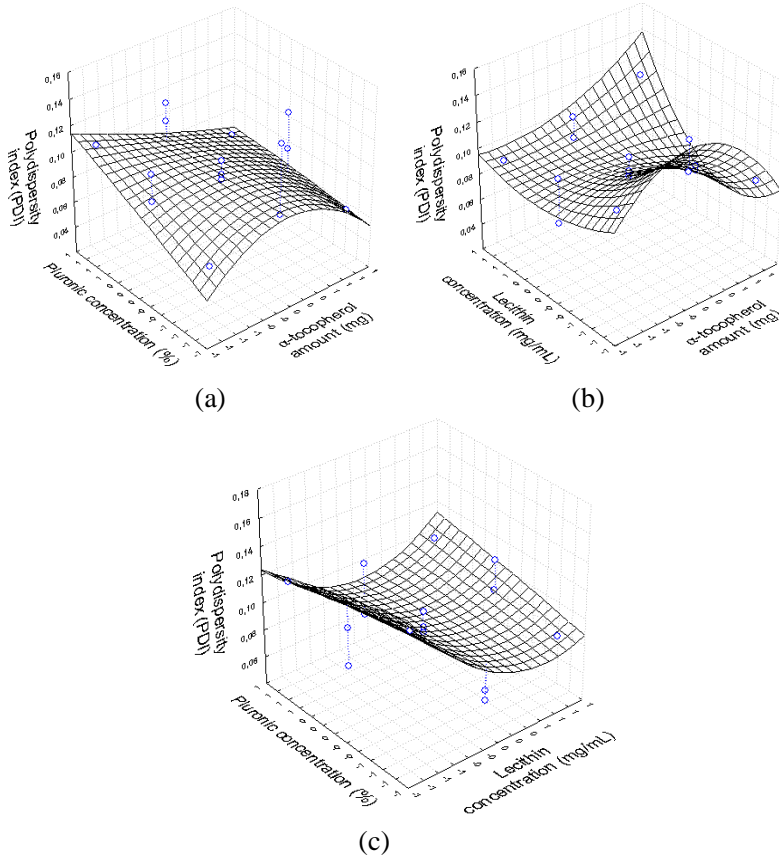
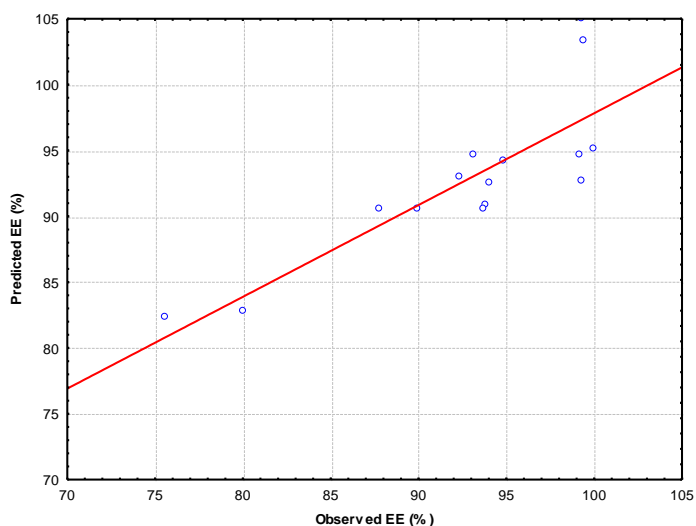


Figure 5: Response surface obtained from Box–Behnken design for polydispersity index (PDI) as a function of: a) α -tocopherol amount and Pluronic F68 concentration b) α -tocopherol amount and lecithin concentration and c) Pluronic F68 and lecithin concentrations.

3.4 Optimisation of conditions for encapsulating α -tocopherol

The optimal conditions of α -tocopherol encapsulation was selected based on the criteria of attaining the maximum predicted and observed values of %EE, minimizing the PS and PDI. Upon evaluating the three response variables, the formulation composition with α -tocopherol 200 mg, lecithin 2.5 mg/mL and Pluronic F68 1% (w/w) was

found to achieve requisites of an optimum formulation. The optimized formulation has the %EE of 95.08, 187.91 nm of PS and 0.114 of PDI predicted values. In addition, in these conditions the α -tocopherol recovery presented the highest value (90.34 %) and the potential zeta showed -40.3 mV. Fig. 6 indicates a satisfactory correlation between the observed and predicted values of %EE, PS and PDI. For all of the variable responses, the results were found to be within limits, since the points cluster around the diagonal line presented less deviation between the experimental and predicted values, indicating a good fit of the model.



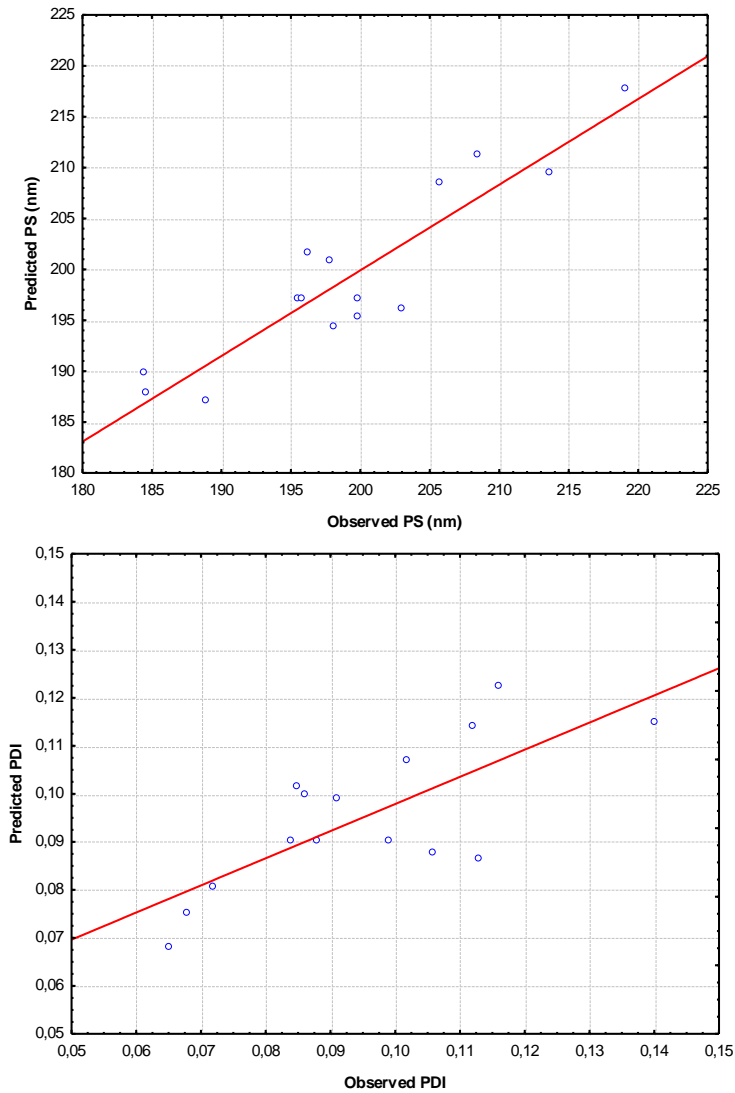


Figure 6: Linear correlation plots between observed and predicted values for the %EE, PS and PDI responses.

3.5 Morphology evaluation

Fig. 7 shows the TEM micrographs of the α -tocopherol-loaded PCL nanocapsules under optimized conditions. The shape of nanocapsules was spherical and distorted. Some agglomerations can be noticed with the beginning of crystallization. The capsular structure consists of the polymer membrane as a line surrounding an oily core. The nanocapsule mean size, as observed by TEM, correlated well with the mean size obtained using the light-scattering particle size analyzer Malvern Zetasizer.

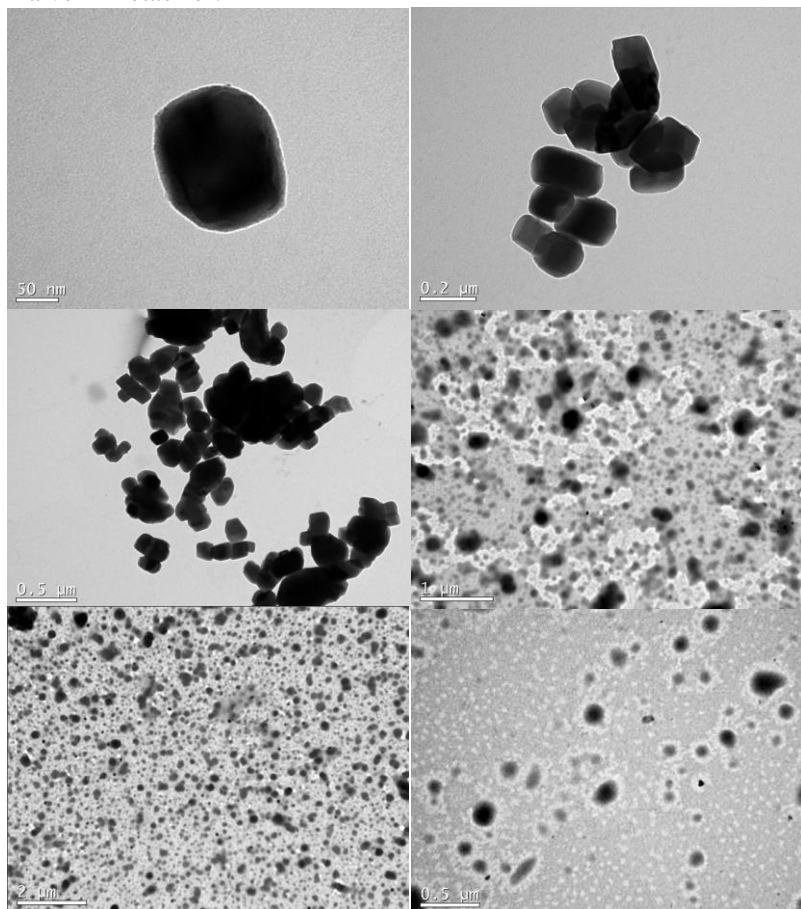


Figure 7: Transmission electron microscopy (TEM) of α - tocopherol loaded PCL nanocapsules under optimized conditions.

Conclusions

The results obtained shown that nanoprecipitation is a suitable method for the preparation of α -tocopherol loaded PCL nanocapsules, with potential applications in food technology, due the high values of recovery (%) and encapsulation efficiency (%) of α -tocopherol. In addition, lecithin was responsible for the excellent stability of the suspensions, by confirming the zeta potential. The capsular structure could be observed by TEM microscopy. It has been shown that α -tocopherol amount, lecithin and Pluronic F68 concentrations affected the encapsulation efficiency (%), particle size (PS) and polydispesity index (PDI), as confirmed by Surface Response Methodology. The optimal conditions could be chosen based on the encapsulation efficiency (%) due to the high α -tocopherol content. It can be concluded that the optimum conditions to prepare the α -tocopherol loaded PCL nanocapsules would be: 200 mg of α -tocopherol, 2.5 mg/mL of lecithin, and 1.0% (w/w) of Pluronic F 68 concentrations.

Acknowledgements

The authors thank the CAPES for its financial support, and LCME/UFSC for microscopic analysis.

References

- AMELLER, T.; MARSAUD, V.; LEGRAND, P.; GREF, R.; BARRATT, G.; RENOIR, J.M. Polyester-poly (ethylene glycol) nanoparticles loaded with the pure antiestrogen RU 58668: physiochemical and opsonization properties. *Pharmaceutical Research*, v.20, p. 1063–1070, 2003.
- AMIN, N.A.S.; ANGGORO D.D. Optimization of direct conversion of methane to liquid fuels over Cu loaded W/ZSM-5 catalyst. *Fuel*, v.83, p. 487–494, 2004.
- BARRERA-ARELLANO D.; RUIZ-MÉNDEZ V.; VELASCO J.; MÁRQUEZ-RUIZ G.; DOBARGANES C. Loss of tocopherols and formation of degradation compounds at frying temperatures in oils differing in degree of unsaturation and natural antioxidant content.

Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 82, p. 1696-1702, 2002.

BOX, G.E.P.; BEHNKEN, D.W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, v. 2, p. 455-475, 1960.

BOUCHEMAL, K.; BRIANCON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 280, p. 241-251, 2004.

BYUN, Y.; HWANG, J.B.; BANG, S.H.; DARBY, D.; COOKSEY, K.; DAWSON, P.L.; PARK, H.J.; WHITESIDE, S. Formulation and characterization of α -tocopherol loaded poly ϵ -caprolactone (PCL) nanoparticles. *Food Science and Technology*, v. 44, p. 24-28, 2011.

CALVO, P.; REMUFIFIN-LDPEZ, C.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Development of positively charged colloidal drug carriers: chitosan-coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions. *Colloid and Polymer Science*, v. 275, p. 46-53, 1997.

EITENMILLER, R.R.; LEE, J. *Vitamin E: Food Chemistry. Composition and Analysis*. New York: Marcel Dekker, (Chapter 3), 2004.

FARHANG, B. Nanotechnology and lipids. *Lipid Technology*, v. 19, p. 6, 2007.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 55, p. 25-28, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 280, p. 1-8, 1990.

HATANAKA, J.; CHIKAMORI, H.; SATOA, H.; UCHIDA, S.; DEBARI, K.; ONOUEA, S.; YAMAD, S. Physicochemical and pharmacological characterization of α -tocopherol-loaded nano-emulsion

system. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 396, p. 188-193, 2010.

HENSLEY, K.; BENAKSAS, E. J.; BOLLI, R.; COMP, P.; GRAMMAS, P.; HAMDHEYDARI, L.; MOU, S.; PYE, Q.N.; STODDARD, M.F.; WALLIS, G.; WILLIAMSON, K.S.; WEST, M.; WECHTER, W. J.; FLOYD, R.A. New Perspectives on Vitamin E: γ -Tocopherol and Carboxyethylhydroxychroman Metabolites in Biology and Medicine. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 36, p. 1-15, 2004.

JOO, H.H.; LEE, H.Y.; GUAN, Y.S.; KIM, J.C. Colloidal stability and in vitro permeation study of poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules containing hinokitiol. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 14, p. 608-613, 2008.

KHAJEH, M. Response surface modelling of lead pre-concentration from food samples by miniaturised homogenous liquid-liquid solvent extraction: Box-Behnken design. *Food Chemistry*, 129, 1832-1838, 2011.

KHAYATAA, N.; ABDELWAHEDA, W.; CHEHNA, M.F.; CHARCOSSETB, C.; FESSI, H. Preparation of vitamin E loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method: From laboratory scale to large scale using a membrane contactor. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 423, p. 419-427, 2012.

KHOEE, S.; YAGHOUBIAN, M. An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 44, p. 2392-2399, 2008.

MAZZARINO, L.; BELLETTINI, I.C.; MINATTI, E.; LEMOS-SENNA, E. Development and validation of a fluorimetric method to determine curcumin in lipid and polymeric nanocapsule suspensions. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 46, p. 219-226, 2010.

MORA-HUERTAS, C.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 385, p. 113-142, 2010.

MOTWANI, S.K.; CHOPRA, S.; TALEGAONKAR, S.; KOHLI, K.; AHMAD, F.J.; KHAR, R.K. Chitosan–sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: Formulation, optimization and in vitro characterization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 68, p. 513–525, 2008.

MUNE, M.A.M.; MINKA, S.R.; MBOME, I.L. Functional properties of acetylated and succinylated cowpea protein concentrate and effect of enzymatic hydrolysis on solubility. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v. 62, p. 310-317, 2011.

SABLIOV, C. M.; FRONCZEK, C.; ASTETE, C. E.; KHACHATURYAN, M.; KHACHATRYAN, L.; LEONARDI, C. Effects of Temperature and UV Light on Degradation of α -Tocopherol in Free and Dissolved Form. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 86, p. 895-902, 2009.

SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; PONTES, A.; PEREIRA, V.M.W.; CAETANO, M.N.P. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 208, p. 71–80, 2000.

SEIJO, B.; FATTAL, E.; ROBLOT-TREUPEL, L.; COUVREUR, P. Design of nanoparticles of less than 50 nm diameter: preparation characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 62, p. 1-7, 1990.

SEKHON, B. S. Food nanotechnology: an Overview Nanotechnology. *Science and Applications*, v. 3, p. 1-15, 2010.

SIEGRIST, M.; COUSINB, M-E.; KASTENHOLZ, H.; WIEKD, A. Public acceptance of nanotechnology foods and food packaging: The influence of affect and trust. *Appetite*, v. 49, p. 459-466, 2007.

SOARES, S. E. Phenolic acids as antioxidants. *Revista de Nutrição*, v. 15, p. 71-81, 2002.

SOZER, N.; KOKINI, J.L. Review Nanotechnology and its applications in the food sector. *Trends in Biotechnology*, v. 27, p. 82-89, 2009.

STELLA, B.; ARPICCO, S.; ROCCO, F.; MARSAUD, V.; RENOIR, J.M.; CATTEL, L.; COURVEUR, P. Encapsulation of gemcitabine lipophilic derivatives into polycyanoacrylate nanospheres and nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 344, p. 71-77, 2007.

WOODRUFF, M.A.; HUTMACHER, D.W. The return of a forgotten polymer: Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*, v. 35, p. 1217-1256, 2010.

YOO, S.-H.; SONG, Y.-B.; CHANG, P.-S.; LEE, H.G. Microencapsulation of α -tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 38, p. 25-30, 2006.

ZAMBRANO-ZARAGOZA, M.L.; MERCADO-SILVA, E.; GUTIÉRREZ-CORTEZ, E.; CASTAÑO-TOSTADO, E.; QUINTANAR-GUERRERO, D. Optimization of nanocapsules preparation by the emulsion e diffusion method for food applications. *Food Science and Technology*, v. 44, p. 1362-1368, 2011.

ZHU, Y.; ZHANG, G.; YANG, H.; HONG, X. Influence of surfactants on the parameters of polylactide nanocapsules containing insulin. *Journal of Surfactants and Detergents*, v. 8, p. 353-358, 2005.

ZILI, Z.; SFAR, S.; FESSI, H. Preparation and characterization of poly- ϵ - caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 294, p. 261-267, 2005

CAPÍTULO 3: DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
FILMES DE METILCELULOSE CONTENDO NANOCÁPSULAS DE
 α -TOCOFEROL

Introdução

Atualmente, a maioria das embalagens flexíveis é produzida a partir de materiais plásticos derivados do petróleo, ou seja, de fonte não renovável. Além disso, por não serem biodegradáveis, causam grandes problemas ambientais quando são descartados (SOARES et al., 2005). Recentemente, surgiu um grande interesse pelo desenvolvimento de embalagens biodegradáveis, devido à demanda por alimentos ecologicamente corretos e também às preocupações ambientais. Diante disso, novas pesquisas têm contribuído para o desenvolvimento de biofilmes a partir de materiais renováveis que possam substituir os sintéticos (KESTER; FENEMA, 1986).

Diversos compostos naturais podem ser empregados na produção de biofilmes, como, polissacarídeos, proteínas, lipídios, entre outros. Biofilmes desenvolvidos a partir de polissacarídeos, como a metilcelulose, apresentam boas propriedades mecânicas e sensoriais, atuando também como barreiras efetivas de aromas e gases. Além disso, existe a possibilidade de incorporação de aditivos nos filmes (antioxidantes, aromas, agentes antimicrobianos e nanomateriais) visando melhorar a qualidade do produto. No entanto, a maior limitação para a aplicação desses filmes é devido a sua alta hidrofilicidade (KESTER; FENEMA, 1986).

Além de excelentes propriedades de barreira, é necessário que os biofilmes possuam propriedades mecânicas eficientes, garantindo sua integridade durante o manuseio. A incorporação de nanoestruturas tem sido utilizada para melhorar as características dos filmes biodegradáveis (AOUADA et al., 2009).

Em vista disso, este capítulo relata o desenvolvimento de biofilmes de metilcelulose contendo nanocápsulas de α -tocoferol para aplicação em embalagens ativas de alimentos. A adição de nanocápsulas na matriz polimérica de metilcelulose pode trazer a dupla vantagem de melhorar as características do material e também fornecer uma funcionalidade adicional, como a propriedade antioxidante. Os biofilmes foram desenvolvidos pela técnica de “casting” com a adição da formulação de nanocápsulas otimizada, conforme apresentado no Capítulo 2. Foi analisado o efeito da adição de nanocápsulas sobre as propriedades mecânicas, de molhabilidade, cor e transmissão de luz dos filmes. A morfologia dos filmes, atividade antioxidante e liberação do α -tocoferol para o simulante de alimentos também foi estudada.

*Publicação: Characterization of antioxidant methylcellulose film
incorporated with α -tocopherol nanocapsules*

Artigo submetido à revista científica

Characterization of antioxidant methylcellulose film incorporated with α -tocopherol nanocapsules

Carolina Montanheiro Noronha^{1*}, Sabrina Matos de Carvalho¹, Renata Calegari Lino¹, Pedro Luiz Manique Barreto²

1Program in Food Science, Federal University of Santa Catarina, Florianopolis, SC, 88040-970, Brazil

2 Department of Food Science, Federal University of Santa Catarina, Florianopolis, SC, 88040-970, Brazil

Corresponding Author: Pedro Luiz Manique Barreto

Postal address: Department of Food Science, Federal University of Santa Catarina, Florianopolis, Santa Catarina, Brazil

Phone: +55 (48) 3721-5368

e-mail: plmbarreto@gmail.com

Abstract

Biodegradable and antioxidant films based on methylcellulose (MC) incorporated with α -tocopherol nanocapsule suspension (NCs) were developed. The MC and NCs films in three different proportions were prepared by a casting method. The mechanical, wettability, color, light transmission, antioxidant and release characteristics of the films were studied. The addition of NCs to MC films decreased the tensile strength (TS) and the elastic modulus (EM) ($p < 0.05$), and increased the percent elongation at break and thickness ($p < 0.05$). The NCs films showed a higher hydrophobicity compared with the film control. The lightness and yellowish color were intensified in the films containing NCs. The NCs films showed a great antioxidant activity and excellent barrier proprieties against UV and visible light. In addition, it was observed a burst release of α -TF to food simulant.

Keywords: Biofilms, Methylcellulose, Active and biodegradable packaging, Nanocapsules, α -Tocopherol, Antioxidant proprieties.

1 Introduction

Nowadays, most of the traditional packaging materials are produced from fossil fuels and are practically non degradable, which increase environmental pollution. The exploration of new bio-based packaging materials, such as edible and biodegradable films from renewable resources, could at least to some extent solve the waste problem (SORRENTINO; GORRASI; VITTORIA, 2007; SOZER; KOKINI, 2009).

Edible polymer films include polysaccharides, lipids, proteins or a blend of these macromolecules. Cellulose is one of the most abundant and renewable polysaccharides on earth, composed of linear chains of β (1–4) (MILLER; KROCHTA, 1997; THARANATHAN, 2002). Cellulose derivative based edible films, such methylcellulose, are very efficient barriers to oxygen and aroma compound barriers. Methylcellulose (MC) has excellent film making characteristics with high solubility and low oxygen and lipid permeabilities (DEBEAUFORT; VOILLEY, 1997).

In the last decades, active packaging is one of the most innovative developments in the area of food packaging. The meaning of the active packaging is the extension of the shelf-life of the food and the maintenance or even improvement of its quality, by its interaction with the food and/or environment (SUPPAKUL et al., 2003; DAINELLI et al., 2008). Bioactive packaging materials need to be able to keep bioactive compounds, such as prebiotics, probiotics, encapsulated vitamins or bioavailable flavonoids, in optimum condition until they are released in a controllable manner into the food product (SOZER; KOKINI, 2009).

To prevent the lipid oxidation of oils, fats and foods containing unsaturated lipids, the antioxidants are widely used as food additives to prolong shelf-life and avoid the formation of off-flavors and undesirable textures of food. Antioxidants can also be incorporated into plastic films for polymer stabilization in order to protect the films from degradation and, furthermore, can help to control oxidation of food stuffs. Also, the release of the antioxidant must be proved to be in sufficient amount to ensure efficient antioxidant protection (VERMEIREN et al., 1999; SOZER; KOKINI, 2009; MANZANAREZ-LÓPEZ et al., 2011).

The use of synthetic antioxidants in contact with foods has been questioned due its possible toxic effects (VERMEIREN et al., 1999; EITENMILLER; LEE, 2004). Therefore, it is desirable to find natural

and harmless antioxidants. Recently, α -tocopherol or vitamin E have been suggested for integration in polymer films to exert their antioxidative effects. α -Tocopherol is a lipid-soluble antioxidant which have been used as a food additive since are well recognized as safe substance for food products (VERMEIREN et al., 1999; SOZER; KOKINI, 2009).

In view of this, nanotechnology has the potential to influence the packaging sector by delaying oxidation. The addition of active nanoparticles into polymer matrices could bring the twofold advantage to improve the performance of food packaging material and to impart it an additional functionality (antimicrobial, antioxidant, radical-scavenger) (SEKHON, 2010). Bioactive compounds that are encapsulated into the packaging itself are a promising approach because this would allow the control release of the active compounds to reduce oxidation (SOZER; KOKINI, 2009). Polymeric nanoparticles can be produced using polymers, including carrageenan, chitosan, gelatin, polylactic acid, polyglycolic acid alginate and poly ϵ -caprolactone (PCL). Regarding to the literature, PCL is hydrophobic, semi-crystalline, non-toxic, biodegradable and biocompatible polyester that has been used to release encapsulated compounds (SOZER; KOKINI, 2009; WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

Recently there has been an increasing interest in the tocopherol encapsulation, because this compound is labile to heat, light and oxygen. Moreover, the encapsulated tocopherol allows a controlled release and a better solubility in hydrophilic matrices of this lipophilic compound (YOO et al., 2006; SABLIOV et al., 2009; KHAYATA et al., 2012).

The aim of this study was to develop biodegradable films of methylcellulose incorporated with α -tocopherol nanocapsules, as an antioxidant for active packaging applications. The effect of nanocapsules addition in the MC based films on mechanical, physical and optical properties was analyzed. The antioxidant activity and antioxidant release to food stimulant were also evaluated.

2 Materials and Methods

2.1 Materials

α -Tocopherol (98% purity HPLC grade), poly ϵ -caprolactone (PCL, M_w 70,000 – 90,000) and methylcellulose (MC) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Soybean lecithin with 70%

phosphatidylcholine (LIPOID S 75) was supplied by Lipoid (Ludwigshafen, Germany) and Poloxamer (Pluronic F68) was kindly provided by BASF Chemical Company (EUA). Except for the methanol of HPLC grade used in the analysis (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), all others chemicals reagents and solvents were analytical grade.

2.2 Methods

2.2.1 Preparation of PCL nanocapsule suspensions containing α -tocopherol

PCL nanocapsule suspension (NCs) containing α -tocopherol (α -TP) were prepared using the nanoprecipitation method as described by Fessi et al. (1989). Firstly, 70 mg of PCL was dissolved in 2.0 mL of acetone at 50°C in an ultrasonic bath. Thereafter, 10 mL of a solution containing 2.5 mg/mL of lecithin in acetone and ethanol (60:40, v/v) were added to the PCL acetonic solution. The resulting solution was mixed with 200 mg α -TP, and this organic phase was poured into an aqueous phase (25.0 mL) containing 1% (w/v) the hydrophilic surfactant (Pluronic F68) under moderate magnetic stirring, at 25 °C. The aqueous phase immediately turns milky with bluish opalescence as a result of the formation of NCs. The organic solvents were then eliminated by evaporation and the final volume was adjusted to 20.0 mL. The NCs were filtered through 8 μ m pore-sized filter paper (J-Prolab, São José dos Pinhais, Brazil).

2.2.2 Film preparation

Film forming solutions were prepared dissolving MC (2.25%, w/w) in distilled water and the NCs was incorporated to obtain final concentrations of 30, 50 and 70% (w/w) in the film-forming solution, at 25°C, using a magnet stirrer. The MC pure (film control) and NCs films were prepared by casting solutions of polymers, by pouring 10 mL in the lids of the Petri-dishes. Films were then left in a dark room, on a leveled surface, at 25°C, until completely drying. Dried films were removed manually using a spatula and stored in a desiccator for further characterization.

2.2.3 Film thickness

Film thickness was measured using a digital micrometer (Digimess, 110.284, São Paulo, Brazil). Five measurements were taken at different locations of each film sample and the mean values were used to calculate the mechanical properties.

2.2.4 Mechanical properties

The tensile strength (TS), percentage elongation at break (% E), and elastic modulus (EM), or Young's modulus, were measured according to the standard method ASTM D882-95a, using a Stable Micro System TA.XT2, equipped with a 50 kgf static load cell. Initial grip separation and crosshead speed were performed at 5 cm and 25 mm.min⁻¹, respectively. The film samples were cut in rectangular shape (5 x 2,5 cm) and all film strips were equilibrated for one week to 70% RH in a desiccator using saturated NaCl solution at 25°C, before measurements. The mechanical properties were analyzed as a function of nanocapsules concentrations in each film. TS and EM were expressed in MPa, and % E was expressed in percentage (%). The values are the average of replicated of ten measurements for each film sample.

2.2.5 Wettability and surface free energy

These properties were characterized by static contact angle measurements which were carried out by the sessile drop method using a contact angle meter OCA 15EC (Filderstadt, Germany) high performance image processing system from Data Physics Instruments. A drop of two different standard liquids, deionized water ($\gamma^T = 72.8$ mN/m, $\gamma^d = 21.8$ mN/m, $\gamma^p = 51.0$ mN/m) and diiodomethane ($\gamma^T = 50.8$ mN/m, $\gamma^d = 50.8$ mN/m, $\gamma^p = 0$ mN/m), with 5 μ L and 0.8 μ L, respectively was added by a motor-driven syringe at 25 °C. The average value of the angles from both sides of each drop is counted as one measurement. Three measurements were carried out for each sample. The presented data correspond to the final average value. The surface free energy and its components (polar and dispersive) were calculated by Owens–Wendt method (Eqs. 1 and 2).

$$\gamma_S^T = \gamma_S^d + \gamma_S^p \quad (1)$$

$$\gamma_L(1 + \cos \theta) = 2 \left(\sqrt{\gamma_S^d \gamma_L^d} + \sqrt{\gamma_S^p \gamma_L^p} \right) \quad (2)$$

2.2.6 Color measurement

The color of the films was determined using a Minolta colorimeter (CR 400; Minolta, Japan), employing CIELab scale. Color values L^* (luminosity), a^* (red-green), b^* (yellow-blue) were obtained with three measurements around the film samples. A white disk was used as standard for calibration and as a background. The color difference (ΔE_{ab}) was calculated using the control film (MC) as standard, by Equation 3.

$$\Delta E_{ab} = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2} \quad (3)$$

where $\Delta a = a_{\text{standard}} - a_{\text{sample}}$, $\Delta b = b_{\text{standard}} - b_{\text{sample}}$ and $\Delta L = L_{\text{standard}} - L_{\text{sample}}$.

2.2.7 Light transmission

Transparency was measured using a UV-visible spectrophotometer HITACHI, U-1800 (Tokyo, Japan), according to the method proposed by Tang et al (2005). Film samples were cut into rectangles (0.7x1.5 cm) and placed in the quartz spectrophotometer cell. Wavelengths at 210 nm and 500 nm were selected to determine the percentages of light transmission in the barrier properties of MC films against ultraviolet (UV) and visible light. The measurements were repeated three times for each film type.

2.2.8 Microscope observations

Scanning electron microscopy (SEM) analysis was performed using a JEOL JSM-6390LV microscope (Tokyo, Japan). Film pieces were mounted on copper stubs using a double-sided tape and then coated with a layer of gold, allowing surface and cross-section visualization. For cross-section observations, films were cryofractured

by immersion of the samples in liquid nitrogen. All samples were examined using an accelerating voltage of 10 kV.

2.2.9 Determination of antioxidant activity

2.2.9.1 DPPH assay

The radical scavenging activity of MC and NCs films was determined using DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical, according to the method of Byun, Kim and Whiteside (2010), with a slight modification. Approximately 100 mg of film samples were cut into small pieces and vortexed for 3 minutes with 5 mL of ethanol. The mixture was allowed to stand at 25°C for 3 h, and then, it was vigorously vortexed for another 3 min. An aliquot of this ethanolic solution (100 μ L) diluted (1/10) was mixed with 2.9 mL of 0.1 mM DPPH in ethanol. The mixture was vigorously stirred and left in the dark at ambient temperature for 30 min. The absorbance was measured at 515 nm using a UV-visible spectrophotometer HITACHI, U-1800 (Tokyo, Japan). All experiments were carried out in triplicate and the antioxidant capacity of films was expressed in % DPPH radical scavenging activity/100 mg of film. DPPH radical scavenging activity was calculated according to the Equation 4:

$$\text{Scavenging activity (\%)} = [(\text{Abs}_{\text{blank}} - \text{Abs}_{\text{sample}}) / \text{Abs}_{\text{blank}}] / 100 \quad (4)$$

where $\text{Abs}_{\text{blank}}$ is the absorbance of the control and $\text{Abs}_{\text{sample}}$ is the absorbance of the sample.

2.2.9.2 ABTS assay

The 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS \bullet^+) radical scavenging capacity of the MC and NCs films samples was determined according to the method of Re et al. (1999). ABTS radical was produced by reacting the stock solution consisted of 7 mM ABTS with 2.45 mM potassium persulfate, and kept in the darkness, at room temperature, for 12–16 h before use. The stock solution was adjusted with ethanol (96°) to obtain an absorbance of 0.70 ± 0.03 at 734 nm. A diluted aliquot (1/10) of the ethanolic solution (60 μ L) containing the 100 mg of film samples was stirred with 294 μ L of the solution containing the ABTS \bullet^+ radical. The absorbance was measured using a

UV-visible spectrophotometer HITACHI, U-1800 (Tokyo, Japan), after 7 minutes at 734 nm. Trolox was used as the standard ($15 \mu\text{M} = 0.13209 \text{ g}/500 \text{ mL}$). A standard curve was obtained by using Trolox standard solution at concentration between 75 and $1050 \mu\text{M}$. All measurements were performed in triplicate and the antioxidant capacity of films was expressed in terms of $\mu\text{mol TEAC}$ (Trolox equivalent)/g.

2.2.10 Release tests

The assay conditions of the NCs films migration was based on the Directive 82/711/EEC (European Communities, 1982). In this study, as the α -TP is an antioxidant with hydrophobic characteristics, the simulant D (ethanol 95%) was used to mimic the fatty foodstuffs. According to the Directive 93/8/EEC (European Communities, 1993), the applied time/temperature combination to simulate storage at ambient temperature for unlimited duration was 20°C for 10 days. Film samples ($2 \times 3 \text{ cm}$) were pre-weighed and placed in separated 30 mL amber glass vials, and then completed with the ethanol 95%. The vials were hermetically sealed with open-top cap, and aliquots of $20 \mu\text{L}$ were directly injected into an HPLC (Shimadzu Liquid chromatographer, Tokyo, Japan) to measure the migration of α -TP at each day. This release test was performed at least duplicate. Mean values and standard deviation were calculated by STATISTICA (version 7.0, 2004, StatSoft, Inc., EUA). The release graphs was expressed as the concentration of α -TP released in a particular time, and as the ratio of the α -TP release in a particular time and at equilibrium (M_t/M_∞).

2.2.10.1 High performance liquid chromatographic analysis

The released α -TP were measured during 10 days by direct injection of simulant separately into the HPLC column. The HPLC equipment was a Shimadzu Liquid chromatographer (Tokyo, Japan) equipped with a CBM-20A system controller, an LC-20AT pump system, an SPD-M20A photodiode array detector, a CTO-20A oven, and an SIL-20A auto sampler. The analysis was carried out using a Shim-pack CLC-ODS(M) column ($250 \times 4,6 \text{ mm}$, I.D., $5 \mu\text{m}$ particle size) Shimadzu, (Kyoto, Japan), protected by a guard cartridge system, Shim-pack CLC G-ODS (4) ($12,5 \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$ particle size) Shimadzu (Tokyo, Japan). The quantitative measurement of α -tocopherol content was done at $\lambda = 292 \text{ nm}$ with a mobile phase of

methanol:water (99:1) (v/v) at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. The analytical column was kept at 50°C and the injection volume was 50 µL. The data were stored and processed by a Workstation LC solution (Tokyo, Japan).

The linearity of the determination method was measured by injecting standard solution of different concentrations. Injections were done in triplicate at each concentration. The calibration curves of peak area versus α -tocopherol concentration was linear in the concentration range of 0.2–1.0 mg/mL. The correlation coefficient R^2 was 0.9998.

2.3 Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using (ANOVA; Statistica 7.0, StatSoft Inc). Data were presented as the mean \pm standard deviation of each treatment and Duncan's multiple range tests were performed to determine the significant differences. A level of $p < 0.05$ was considered significant.

3 Results and discussion

3.1 Film thickness

The thickness of edible films is considered an important parameter because it can influence in the biological properties and the shelf life of the coated food (AKHTAR et al., 2012). The nature of film-forming polymer and additives content affect film thickness by their interactions with the polymeric matrix (SALMIERI; LACROIX, 2006; SEBTI et al., 2007).

The values of thickness varied between 39.0 ± 1.84 µm and 61.0 ± 4.91 µm, as shown in Table 1. Significant differences ($p < 0.05$) were observed by comparing the pure MC film (control film) with films containing NCs in all proportions. Film thickness increases when the proportion of NCs in films composition also increases. The higher percentage of NCs in the film resulted a film with the higher thickness (70%NCs). Furthermore, the small standard errors indicate good films homogeneity. Similar results were reported by Chen and Lai (2008) by the addition of glycerol as a plasticizer in carbohydrate films. Park and Zhao (2004) also observed that film thickness increased along with an increased amount of mineral or vitamin E added into the chitosan-based films. The increase in film thickness may be a combined effect of NCs

and surfactants in polymeric matrix, which could indicate a plasticizing effect on film thickness.

3.2 Mechanical properties

Table 1 shows the values of elastic modulus (EM), tensile strength (TS) and percent elongation at break (%E) for the different proportions of NCs into MC films. The tensile strength is the measurement of maximum strength of a film to withstand against applied tensile stress (PARK et al., 2004).

Table 1: Thickness, elastic modulus, tensile strength and % elongation at break of methylcellulose films incorporated with NCs.

Film types	Thickness (μm)	EM (MPa)	TS (MPa)	% E
MC control	39 ± 1.84^b	1193.36 ± 158.22^d	57.82 ± 7.17^c	17.91 ± 1.78^c
30%NCs	46 ± 6.26^a	818.05 ± 51.94^c	30.67 ± 2.26^a	13.13 ± 3.58^b
50%NCs	52 ± 7.30^a	508.02 ± 48.49^b	29.52 ± 3.53^a	26.82 ± 4.98^a
70%NCs	61 ± 4.91^c	387.29 ± 45.52^a	23.19 ± 1.44^b	30.03 ± 1.94^a

Values are given as mean \pm standard deviation. Different letters in the same column indicate significantly different ($p < 0.05$) when analyzed by Duncan's New Multiple Range Test.

The TS values significantly decrease from 57.82 ± 7.17 (film control) to 23.19 ± 1.44 MPa when the percentage of NCs was higher (70% NCs) ($p < 0.05$). Martins, Cerqueira and Vicente (2012) noted that α -tocopherol incorporation significantly decreased the TS of the chitosan films ($p < 0.05$). Norajit, Kim and Ryu (2010) observed that the incorporation of ginseng extracts in alginate films caused a significant reduction in tensile strength compared with the film control. Jongjareonrak et al. (2008) also suggested a significantly decrease of TS on fish skin gelatin films incorporated with α -tocopherol.

The EM significantly decreased with the addition of NCs in comparison with the control films ($p < 0.05$). The control film presented the higher EM (1193.36 ± 158.22) while the 70%NCs film displays a value of 387.29 ± 45.52 .

Elongation at break (%E) is a measure of the film's stretch ability prior to breakage. Significant changes ($p < 0.05$) were observed on %E with the NCs incorporation in the MC films by comparing with the

control film. The increase of %E values indicates that the NCs incorporations improve a higher flexibility on the MC films. The higher value was obtained for 70%NCs film (30.03 ± 1.94 %); however, the %E of 30%NCs film (13.13 ± 3.58 %) was less than the MC film control (17.91 ± 1.78 %).

Siripatrawan and Harte (2010) also relate an increase of %E by incorporation of green tea extract in the chitosan-based films. In this work, the incorporation of NCs inside MC film significantly affected ($p < 0.05$) the mechanical resistance and extensibility of the films.

These results suggest that the addition of hydrophobic substances modify their interactions with film-forming agents. A homogeneous dispersion of hydrophobic NCs into polymeric network of MC could increase the spacing between macromolecule chains, which would reduce ionic and hydrogen bonding between the chains, inducing the development of polymeric structural discontinuities in the films (SALMIERI; LACROIX, 2006; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2009). Moreover, the surfactants contained in the NCs can exert a plasticizer action, increasing the polymer mobility (RODRÍGUEZ et al., 2006).

3.3 Wettability and surface free energy

Contact angle (θ), as a basic wetting property, can indicate how hydrophobic or hydrophilic the surface is (KWOK; NEUMANN, 1999). According to Table 2, the addition of NCs increases significantly ($p < 0.05$) the water contact angle (Fig. 1), indicating that the surface hydrophilicity/hydrophobicity of films has change, however the contact angle values of 50%NCs and 70%NCs films decrease in relation with 30%NCs, but are still higher than MC films. The films surface with NCs are more hydrophobic than MC films. Moreover the contact angle (Fig.1) that the MC film formed with diiodomethane is higher and decreased with the increase of the proportion of NC, which is mainly due to the introduction of some apolar functional groups. Similar changes on contact angle were also reported by Ojagh et al. (2010) and Moradi et al. (2012) for chitosan films incorporated with essential oils.

Regarding the total surface free energy, the MC films showed the highest value for the polar component (hydrophilic) and the lowest value for the dispersive component. However, there was a reduction of the polar component and an increase in dispersive component with the addition of NCs. Among the films containing NCs, with increasing content of NCs were both increased of polar and dispersive component,

although only the films with 70% NCs have presented a surface free energy greater than the films MC.

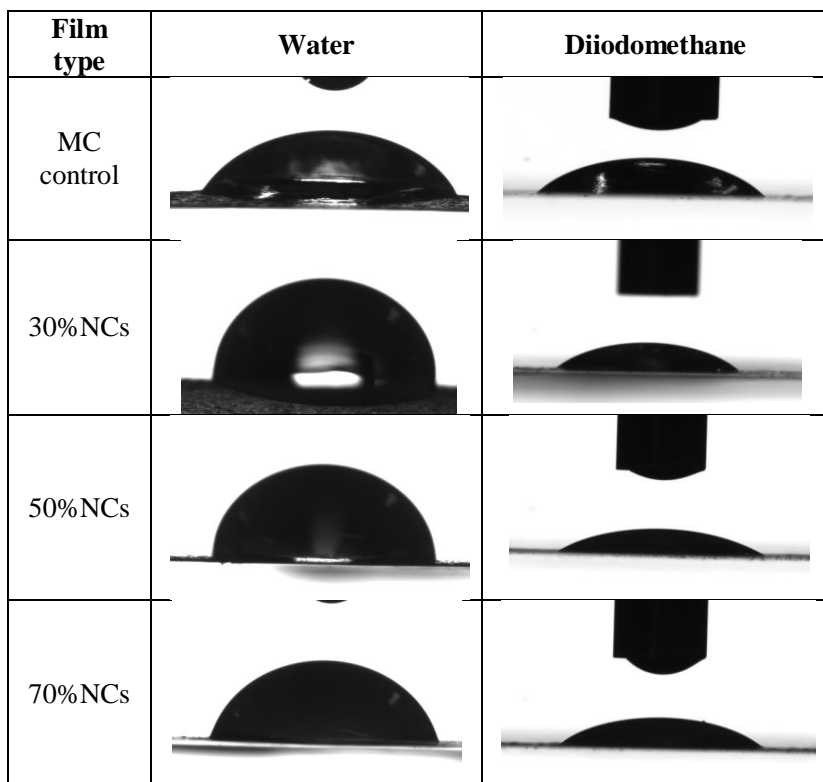


Figure 1: Pictures of film types in two different liquids used to determine the contact angle.

The 30% NCs and 50% NCs films showed lower values of surface free energy in relation to MC films. The higher total surface free energy was observed for the 70%NCs film, mainly by the higher value of dispersive component. It could be explained by the polar and apolar functional groups present in amphiphilic compounds and polymer in NCs formulation.

Table 2: Contact angle ($^{\circ}$) and Surface free energy (γ) of MC films incorporated with NCs to two different liquids.

Film types	Contact angle ($^{\circ}$)		Owens-Wendt		
	Water	Diiodomethane	γ^T (mN/m)	γ^P (mN/m)	γ^D (mN/m)
MC control	67.08 ± 1.66^a	54.90 ± 1.03^d	43.15	11.65	31.50
30%NCs	96.75 ± 1.85^d	43.75 ± 0.88^c	37.91	0.24	37.68
50%NCs	91.20 ± 1.20^c	34.88 ± 1.55^b	42.65	0.56	42.09
70%NCs	75.60 ± 1.25^b	29.88 ± 0.63^a	48.33	4.06	44.27

γ^d : surface free energy (dispersive); γ^p : surface free energy (polar); γ^T : total surface free energy.

Values are given as mean \pm standard deviation. Different letters indicate significantly different ($p < 0.05$) when analyzed by Duncan's New Multiple Range Test.

3.4 Color measurement

The films color parameters (L^* , a^* , b^* color values) and the total color difference (ΔE_{ab}) are shown in Table 3. The incorporation of NCs on MC based films significantly ($p < 0.05$) increase the L^* (lightness/darkness), indicating a slight increase of the lightness of the film. The NCs films showed a greenness by the significant ($p < 0.05$) decrease of a^* values in comparison with the film control. However, no significant difference were observed between the 50%NCs and 70%NCs films for this parameter. The intensification of the yellowness could be noted by b^* values, increasing significantly ($p < 0.05$) from 2.03 ± 0.11 (film control) to 4.49 ± 0.14 (70%NCs film). The significant increase of ΔE_{ab} values ($P < 0.05$) indicates the total color changes of films with the addition of NCs, leading to more colored films. According to Moradi et al. (2012), the addition of various compounds that structurally bind to the film-forming solutions could change the native color of the edible films.

Table 3: Color values and transparency of MC films incorporated with NCs.

Film types	Color values				Transmittance (%)	
	L*	a*	b*	ΔE_{ab}	500 nm	210 nm
MC	97.25 \pm 0.11 ^b	0.16 \pm 0.01 ^c	2.03 \pm 0.11 ^a	N/A	61.70 \pm 2.45 ^d	35.47 \pm 1.51 ^b
30% NCs	97.77 \pm 0.13 ^a	(-0.16) \pm 0.00 ^b	2.81 \pm 0.08 ^b	1.19 \pm 0.26 ^a	30.53 \pm 1.17 ^c	0.80 \pm 0.00 ^a
50% NCs	97.61 \pm 0.12 ^a	(-0.50) \pm 0.02 ^a	4.20 \pm 0.05 ^c	5.59 \pm 0.51 ^b	20.33 \pm 1.94 ^b	0.83 \pm 0.06 ^a
70% NCs	97.58 \pm 0.02 ^a	(-0.51) \pm 0.04 ^a	4.49 \pm 0.14 ^d	6.84 \pm 0.32 ^c	6.77 \pm 0.06 ^a	0.73 \pm 0.06 ^a

Values are given as mean \pm standard deviation. Different letters indicate significantly different ($p < 0.05$) when analyzed by Duncan's New Multiple Range Test.

3.5 Light transmission

The results of MC films with and without NCs are presented in Table 3. The addition of NCs led to an improvement of the film barrier to UV and visible light. In the visible region (500 nm), the transmittance of MC films decreased significantly ($p < 0.05$) with an increase of NCs proportion, and the 70%NCs film, presented the lowest rate of transmittance (6.77 ± 0.06).

In this study, the levels of light transmission in the visible wavelength were much lower than found in previous works (JONGJAREONRAK et al., 2008; NORAJIT et al., 2010; MARTINS et al., 2012), indicating that that NCs incorporation provides an excellent barrier to prevent visible light. In the UV region (210 nm), the addition of NCs decreased significantly ($p < 0.05$) the rate of transmittance compared with film control, however not varied between the films containing NCs. These results suggest that the incorporation of NCs in MC films makes an excellent barrier against UV light and can potentially retard lipid oxidation induced by UV light in food system, as well as the antioxidant effects of α -tocopherol.

3.6 Scanning electron microscopy

SEM micrographs (Fig. 2) evidenced that the morphologies of films were influenced by NCs addition. As shown in Fig. 2a, the cross-sections of the MC control film was smooth and compact, while the NCs films (Fig. 2a, c and e) exhibited a high degree of porosity evenly distributed throughout the film. The surface of MC control film (Fig. 2b) looked more homogeneous than NCs films (Fig. 2b, d and f), which

exhibited a rougher surface and several unequalized holes. According to Xiong, Tang and Zou (2007), the strong chemical bond of each component added in the films led a compact and smooth ultrastructure. In this study, these results suggest that the incorporation of NCs decreased the miscibility and compatibility of MC films, producing a structure more porous and less compact.

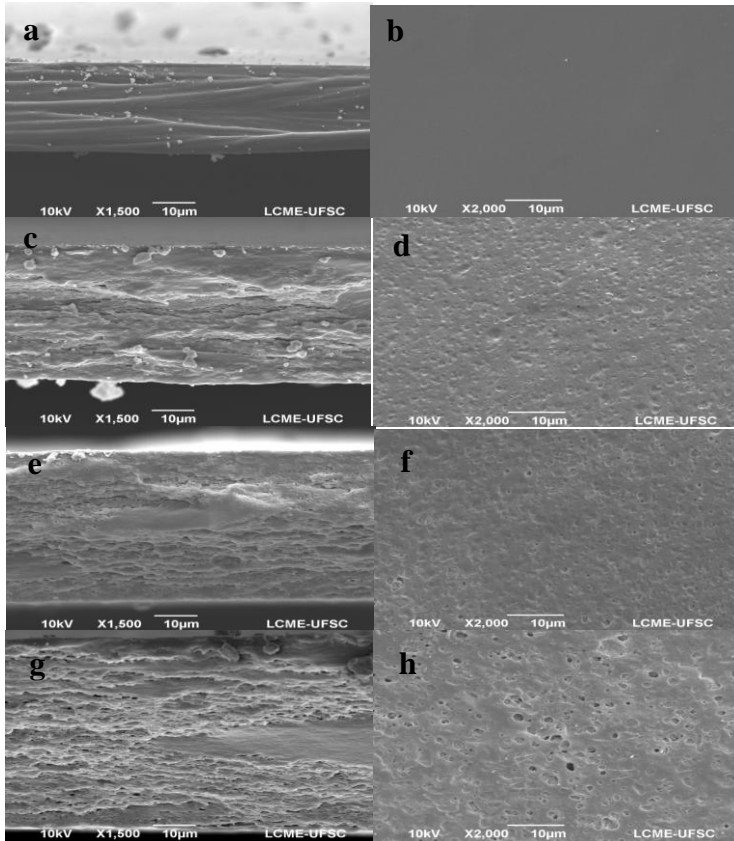


Figure 2: SEM micrographs of a) film control cross-section, b) film control surface, c) 30%NCs film cross-section, d) 30%NCs film surface, e) 50%NCs film cross-section, f) 50%NCs film surface, g) 70%NCs film cross-section and h) 70%NCs film surface. Magnification is indicated in the micrographs.

3.6 Antioxidant activity

Figs. 3 and 4 show the antioxidant activity of MC films with and without incorporated NCs, determined by DPPH and ABTS radical scavenging activity methods. For both assays, the film control had no radical scavenging activity. The results showed that DPPH scavenging activity of the films significantly increased ($p < 0.05$) with NCs concentration as shown in Fig. 3. These results could be confirmed by ABTS radical scavenging activity assay, which reveals a similar behavior of the films by NCs addition. The 70%NCs film exhibited the higher radical scavenging activity (DPPH - 56.21%, ABTS - 223,5 TEAC $\mu\text{Mol/g}$).

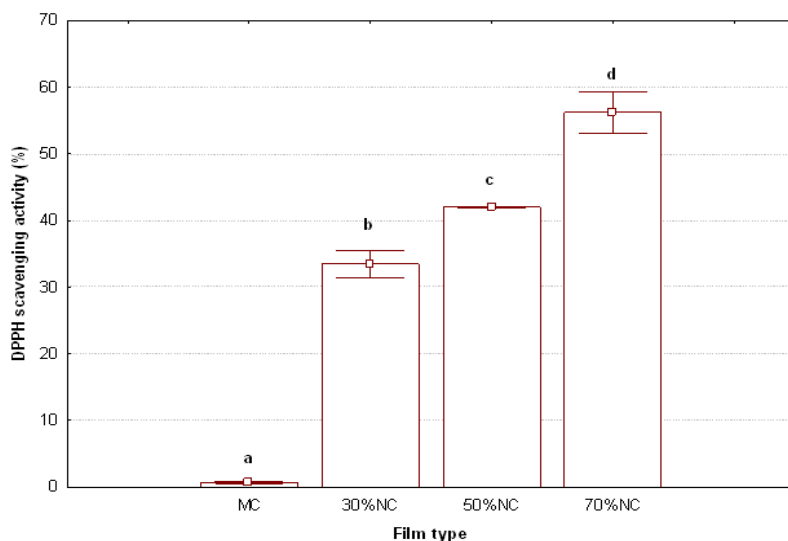


Figure 3: DPPH scavenging activity (%) of MC film control and incorporated with NCs. Values are given as mean \pm standard deviation. Different letters indicate significantly different ($p < 0.05$) when analyzed by Duncan's New Multiple Range Test.

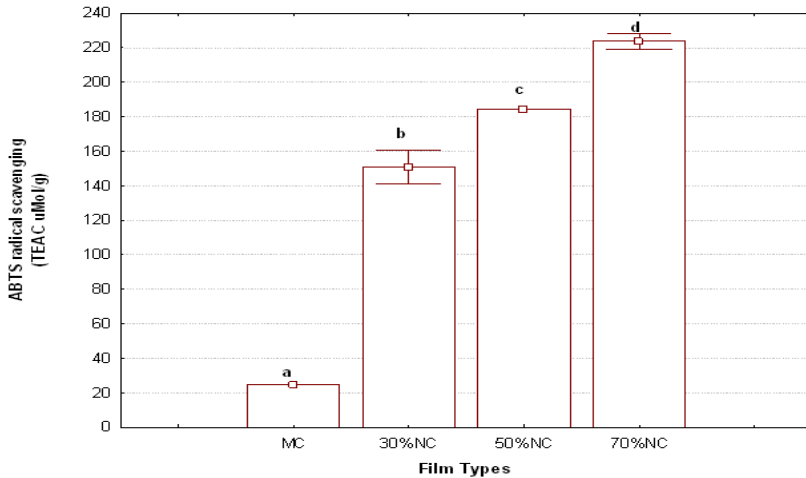


Figure 4: ABTS radical scavenging activity of MC film control and incorporated with NCs. Values are given as mean \pm standard deviation. Different letters indicate significantly different ($p < 0.05$) when analyzed by Duncan's New Multiple Range Test.

According to Moradi et al. (2012), the degree of antioxidant power of edible film generally is proportional to the amount of added antioxidant additives. Recently study reveals the strong scavenging activity by addition of antioxidants in biofilms. Byun et al. (2010) and Martins et al. (2012) has found radical scavenging activity values of 90.43% and 97.71%, respectively, by the addition of α -tocopherol in 100 mg of film. In this study, it has to be considered that the ethanolic extract of the films was diluted 10 times, therefore, the results were expressed in 2 mg of film, indicating that the NCs films presented a powerful scavenging activity, higher than found by these previous reports. Jongjareonrak et al. (2008) related low values for scavenging activity in fish skin gelatin incorporated with BHT and α -tocopherol, due to the interactions of hydrogen bonding between the antioxidants and gelatin film matrix. In this work, as the α -tocopherol was encapsulated, the affinity of hydrophobic NCs and MC film matrix was not strong enough, and could influence in the high amount of α -tocopherol extracted by ethanol. Regarding to the literature, also natural plant extracts and essential oils, as ginseng, green tea, beetroot juice and purple carrot, thyme, oregano, savory and cinnamon, has been

successfully employed in biofilms because of their antioxidant ability (SALMIERI; LACROIX, 2006; ALTIOK; ALTIOK, 2010; NORAJIT et al., 2010; SIRIPATRAWAN; HARTE, 2010; AKHTAR et al., 2012).

3.7 Release tests

The release profiles of α -TP from the NCs films to food stimulant are displayed in Fig 5. The 95% ethanol is recommended by the European Commission as simulant for fats, oil and fatty foods due to its similar hydrophobicity. The α -TP amount was quantified in an HPLC, by obtaining aliquots at 20°C, during 10 days. As a result, the release rate of the α -TP increased with the increase of the NCs percentage in the films. The release profiles of all NCs films exhibited an initial burst effect occurred within 1h and the equilibrium was reached at 2d, presenting a typical Fick's curve.

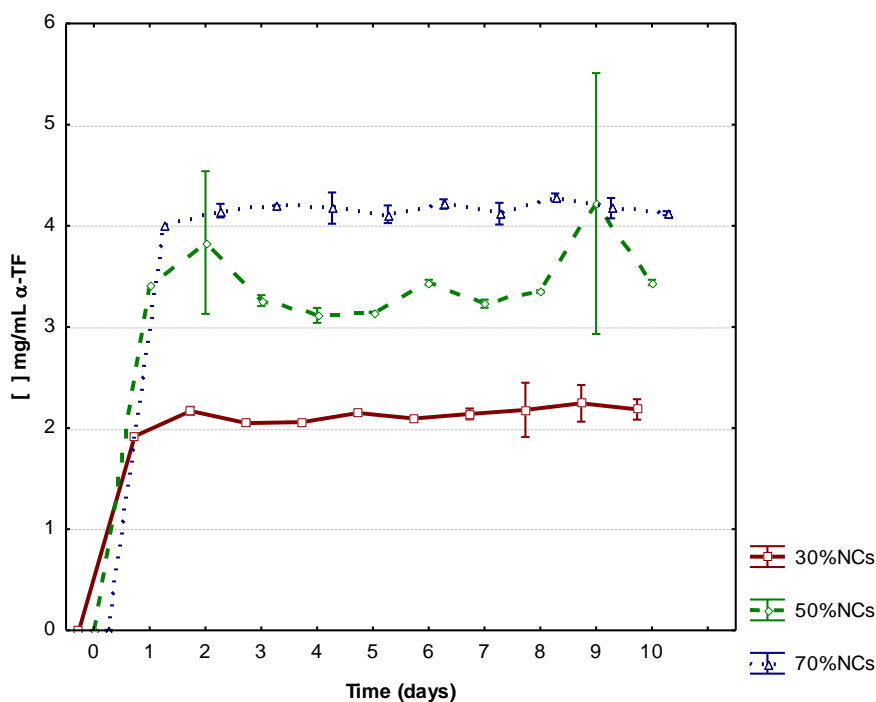


Figure 5: α -Tocopherol concentration release rate into 95% ethanol at 20°C.

Fig. 6 shows the diffusion graphs, expressed as the ratio of the release α -TP in a particular time and at equilibrium (M_t/M_∞), according to Fick's second law. The behavior was similar for the three film types, characterized by the rapidly release of α -TP into simulant with approximately the same velocity.

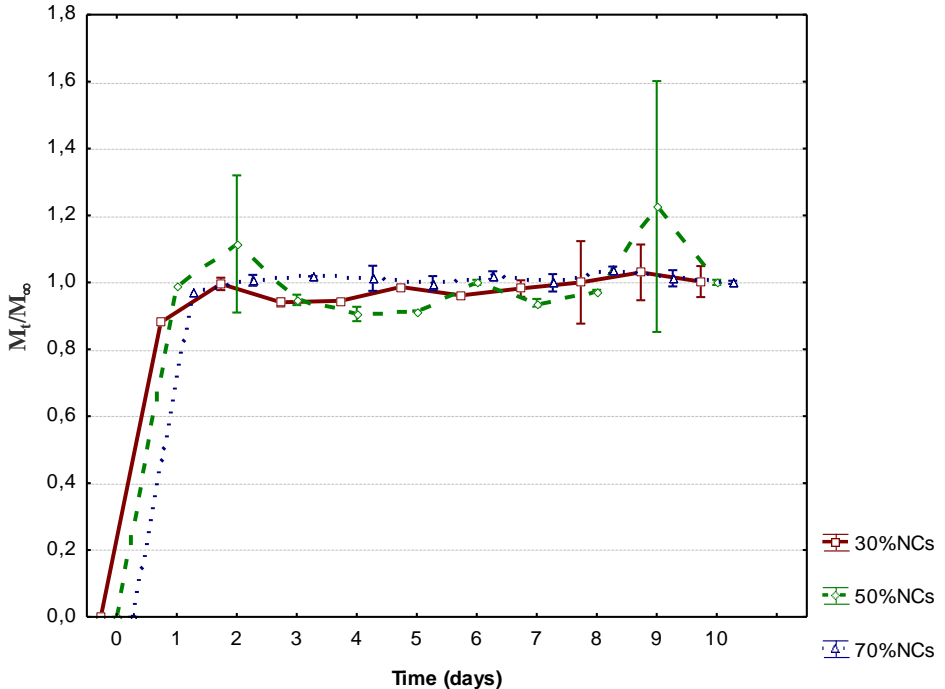


Figure 6: α -Tocopherol release rate (M_t/M_∞) into 95% ethanol at 20°C.

Recent study of α -TP release from poly(lactic acid) films demonstrated a similar behavior for α -TP diffusion at 23°C, using 95% ethanol as stimulant. It was concluded that ethanol acted as an aggressive solvent and can penetrate the PLA chains and promote the diffusion of α -TP (MANZANAREZ-LÓPEZ et al., 2011). Different results were reported by Siró et al. (2006), who found that α -TP complexation by beta-cyclodextrin showed to be an effective tool for controlling the release of α -TP from polyethylene film. In this study, it was expected a control release of α -TP into food stimulant since it was encapsulated. However, the α -TP was promptly release might because

the hydrophobic NCs and α -TP has a higher affinity with the solvent than the hydrophilic matrix of MC.

Conclusion

The present study indicates that the α -tocopherol NCs can be successfully incorporated into biodegradable methylcellulose films, being a promising biopolymer for active food packaging. The addition of NCs influenced mechanical, wettability and color proprieties, improving the elasticity and hydrophobicity of the MC films. The films presented potential antioxidant ability by the NCs incorporation, and the increase of their concentration promoted an excellent barrier against UV and visible light, useful to protect foods from photooxidation. α -TF was rapidly release to food simulant, however the concentration maintained constant. Therefore, these films can be an advantageous alternative for food preservation and shelf-life extension, helpful to prevent the lipid oxidation of fatty foodstuffs.

References

- AKHTAR, M. J.; JACQUOT, M.; JASNIEWSKI, J.; JACQUOT, C.; IMRAN, M.; JAMSHIDIAN, M.; PARIS, C.; DESOBRY, S. Antioxidant capacity and light-aging study of HPMC films functionalized with natural plant extract. *Carbohydrate Polymers*, v. 89, p. 1150 -1158, 2012.
- ALTIOK, D.; ALTIOK, E.; TIHMINLIOGLU, F. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 21, p. 2227- 2236, 2010.
- BYUN, Y.; KIM, Y.T.; WHITESIDE, S. Characterization of an antioxidant polylactic acid (PLA) film prepared with α -tocopherol, BHT and polyethylene glycol using film cast extruder. *Journal of Food Engineering*, v. 100, p. 239-244, 2010.
- DAINELLI, D.; GONTARD, N.; SPYROPOULOS, D.; ZONDERVAN-VAN DEN BEUKEND, E.; TOBBACKE, P. Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. *Trends in Food Science & Technology*, v.19, p. 103-112, 2008.

DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A. Methylcellulose-Based Edible Films and Coatings: 2. Mechanical and Thermal properties as a Function of Plasticizer Content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 45, p. 685- 689, 1997.

DIRECTIVE 82/711/EEC Commission Directive of 18 October 1982, laying down the basic rules necessary for testing migration of the constituents of plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs. *Official Journal of the European Communities*. L. 297.

DIRECTIVE 93/8/EEC Commission Directive of 15 March 1993, amending Council Directive 82/711/EEC laying down the basic rules necessary for testing migration of constituents of plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs. *Official Journal of the European Communities*. L 90, 22–25.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 55, p. 25–28, 1989.

JONGJAREONRAK, A.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; TANAKA, M. Antioxidative activity and properties of fish skin gelatin films incorporated with BHT and α -tocopherol. *Food Hydrocolloids*, v. 22, p. 449-458, 2008.

KHAYATAA, N.; ABDELWAHEDA, W.; CHEHNA, M.F.; CHARCOSSETB, C.; FESSI, H. Preparation of vitamin E loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method: From laboratory scale to large scale using a membrane contactor. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 423, p. 419-427, 2012.

LIEN, E.; REN, S.; BUI, H.; WANG, R. Quantitative structure activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 26, p. 285-294, 1999.

MANZANAREZ-LOPEZ, F.; SOTO-VALDEZ, H.; AURAS, R.; PERALTA, E. Release of α -tocopherol from poly(lactic acid) films, and

its effect on the oxidative stability of soybean oil. *Journal of Food Engineering*, v. 104, p. 508-517, 2011.

MARTINS, J.T; CERQUEIRA, M.A;& VICENTE, A.A. Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. *Food Hydrocolloids*, v. 27, p. 220-227, 2012.

MILLER, K.S.; KROCHTA, J.M. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 81, p. 228-237, 1997.

MORADI, M.; TAJIK, H.; ROHANI, S. M. R; OROMIEHIE, A. R.; MALEKINEJAD, H.; ALIAKBARLU, J.; HADIAN, M. Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with Zataria multiflora Boiss essential oil and grape seed extract. *Food Science and Technology*, v. 46, p. 477-484, 2012.

NORAJIT, K.; KIM, K. M.; RYU, G. H. Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. *Journal of Food Engineering*, v. 98, p. 377-384, 2010.

OJAGH, S.M.; REZAEI, M.; RAZAVI, S.H.; HOSSEINI, S.M.H.H. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry*, v. 122, p. 161-166, 2010.

PARK, S.; ZHAO, Y. Incorporation of a high concentration of mineral or vitamin into chitosan-based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 1933-1939, 2004.

RE, R; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

RODRÍGUEZ, M.; OSÉS, J.; ZIANI, K.; MATÉ, J.I. Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. *Food Research International*, v. 39, p. 840-846, 2006.

SABLIOV, C. M.; FRONCZEK, C.; ASTETE, C. E.; KHACHATURYAN, M.; KHACHATRYAN, L.; LEONARDI, C. Effects of Temperature and UV Light on Degradation of α -Tocopherol in Free and Dissolved Form. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 86, p. 895-902, 2009.

SALMIERI, S.; LACROIX, M. Physicochemical properties of alginate/polycaprolactone-based films containing essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 10205-10214, 2006.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; VARGAS, M.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; CHIRALT, A.; CHÁFER, M. Characterization of edible films based on hydroxypropylmethylcellulose and tea tree essential oil. *Food Hydrocolloids*, v. 23, p. 2102-2109, 2009.

SEBTI, I.; CHOLLET, E.; DEGRAEVE, P.; NOEL, C.; PEYROL, E. Water sensitivity, antimicrobial, and physicochemical analyses of edible films based on HPMC and/or chitosan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 693-699, 2007.

SEKHON, B. S. Food nanotechnology: an Overview nanotechnology. *Science and Applications*, v. 3, p. 1-15, 2010.

SIRIPATRAWAN, U.; HARTE, B.R. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, v. 24, p. 770-775, 2010.

SIRÓ, I.; FENYVESI, É.; SZENTE, L.; de MEULENAER, B.; DEVLIEGHIERE, F.; ORGOVÁNYI, J.; SÉNYI, J.; BARTA, J. Release of α -tocopherol from antioxidative low density polyethylene film into fatty food simulant: Influence of complexation in beta-cyclodextrin. *Food Additives and Contaminants*, v. 23, p. 845-853, 2006.

SORRENTINO, A.; GORRASI, G.; VITTORIA, V. Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology*, v. 18, p. 84-95, 2007.

SOZER, N.; KOKINI, J.L. Review Nanotechnology and its applications in the food sector. *Trends in Biotechnology*, v. 27, p. 82-89, 2009.

SUPPAKUL, P.; MILTZ, J.; SONNEVELD, K.; BIGGER, S.W. Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *Journal of Food Science*, v. 68, p. 408-420, 2003.

TANG, C-H.; JIANG, Y.; WEN, Q-B.; YANG, X-Q. Effect of transglutaminase treatment on the properties of cast films of soy protein isolates. *Journal of Biotechnology*, v. 120, p. 296-307, 2005.

THARANATHAN, R. N. Food-derived carbohydrates – structural complexity and functional diversity. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 22, p. 65-84, 2002.

VERMEIREN, L.; DEVLIEGHERE, F.; VAN BEEST, M.; DE KRUIJF, N.; DEBEVERE, J. Developments in the active packaging of foods. *Trends in Food Science & Technology*, v. 10, p. 77- 86, 1999.

WOODRUFF, M.A.; HUTMACHER, D.W. The return of a forgotten polymer: Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*, v. 35, p. 1217-1256, 2010.

YOO, S.-H.; SONG, Y.-B.; CHANG, P.-S.; LEE, H.G. Microencapsulation of α -tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 38, p. 25–30, 2006.

CONCLUSÕES GERAIS

- As nanocápsulas poliméricas contendo α -tocopherol foram preparadas com sucesso pela técnica da nanoprecipitação, mostrando-se eficiente e viável, com potencial aplicação na tecnologia de alimentos.
- Os modelos polinomiais quadráticos obtidos na superfície de resposta indicaram uma representação adequada dos dados experimentais, com coeficientes de regressão maiores do que 0.85, apresentando um excelente ajuste para as três variáveis independentes analisadas.
- A condição ótima para a encapsulação do α -tocoferol foi determinada a 200 mg de α -tocoferol, 2,5 mg/mL de lecitina e 1% (m/v) de Pluronic F68.
- Foram obtidas suspensões de nanocápsulas leitosas e homogêneas, que se mantiveram com ótima estabilidade e valores de potencial zeta obtidos na faixa de -30,6 a - 51,1 mV. O valor negativo do potencial zeta observado em todas as formulações foi atribuído à presença da lecitina, utilizada como surfactante lipofílico.
- As suspensões de nanocápsulas indicaram uma distribuição unimodal, com valores de índice de polidispersão abaixo de 0,140 e diâmetro médio de partícula na faixa de 184,4 to 219,1 nm.
- A eficiência de encapsulação do α -tocoferol nas nanocápsulas foi elevada, variando entre 75,55 a 99,97% devido à grande afinidade deste composto hidrofóbico pela partícula. A quantidade de α -tocoferol inicialmente adicionada nas formulações obteve também elevadas taxas de recuperação, variando entre 78,31 a 90,34%.
- A técnica empregada conduziu a obtenção de nanopartículas esféricas e não regulares, com estrutura capsular envolvendo o núcleo oleoso, observadas pelo microscópio eletrônico de transmissão.
- Os filmes de MC contendo nanopartículas de α -tocoferol foram obtidos com êxito através da técnica de “casting”.
- As propriedades mecânicas e de molhabilidade foram significativamente modificadas com a incorporação das nanocápsulas, tornando os filmes mais flexíveis e hidrofóbicos, porém menos resistentes.
- A adição de nanocápsulas também afetou os parâmetros de cor dos filmes, como o aumento da luminosidade, apresentando uma coloração levemente amarelada. Os valores da transmissão de luz foram reduzidos, demonstrando que os filmes constituem ótimas barreiras contra a luz UV e visível para evitar as degradações causadas pela foto-oxidação.

- As nanocápsulas conferiram aos filmes uma alta atividade antioxidante. No entanto, foi observada uma liberação “burst” nos filmes nanoestruturados.
- O estudo contribuiu para que novas tecnologias sejam desenvolvidas no setor da nanotecnologia e biofilmes aplicados a preservação dos alimentos.

REFERÊNCIAS

- ABIDI, S.L. Tocol-derived minor constituents in selected plant seed oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 80, n. 4, p. 327-333, 2003.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos. 6 ed. São Paulo: *Editorial Premier*, 2000.
- AOUADA, F.A.; MUNIZ, E.C.; VAZ, C.M.P.; MATTOSO, L.H.C. Correlação entre parâmetros da cinética de intumescimento com características estruturais e hidrofílicas de hidrogéis de poliacrilamida e metilcelulose. *Química Nova*, v. 32, n. 6, p.1482-1490, 2009.
- AZEREDO, H.M.C.; FARIA, A.F.; AZEREDO, A.M.C. Embalagens Ativas para Alimentos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 20. n. 3, 2000.
- AZZI, A.; STOCKER, A. Vitamin E: non-antioxidant roles. *Progress in Lipid Research*, v. 30, p. 231-255, 2000.
- BARRETO, P. L. M. Propriedades físico-químicas de soluções formadoras e de filmes de caseinato de sódio plastificados com sorbitol; *Tese Doutorado*, 2003.
- BYUN, Y.; HWANG, J.B; BANG, S.H.; DARBY, D.; COOKSEY, K.; DAWSON, P.L.; PARK, H.J.; WHITESIDE, S. Formulation and characterization of α -tocopherol loaded poly ϵ -caprolactone(PCL) nanoparticles. *Food Science and Technology*, v. 44, 2011.
- CALLISTER, W.D. Materials Science and Engineering: an introduction. 4 ed., USA: *John Wiley & Sons*, Inc, 1997.
- CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science.*, v. 23, p. 1273-335, 1998.
- DAINELLI, D.; GONTARD, N.; SYROPOULOS, D.; ZONDERVAN-VAN DEN BEUKEN, E.; TOBBACK, P. Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. *Trends in Food Science and Technology*, v. 19, p. 103-112, 2008.

DINGLER, A.; BLUM, R.P.; NIHEUS, H.; MULLER, R.H.; GOHLAS. Solid lipid nanoparticles (SLN tm/Lipopearls TM)- a pharmaceutical and cosmetic Carrier for the application of vitamin E in dermal products. *Journal Microencapsulation*, v. 16, n. 6, p. 751-767, 1999.

EITENMILLER, R.; LEE, J. Vitamin E Food Chemistry, Composition, and Analysis. New York : *Marcel Dekker*, p. 89-135, 2004.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-Ph.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 55, 1989.

FILHO, G.R.; ASSUNÇÃO, R.M.N.; VIEIRA, J.G.; MEIRELES, C.S.; CERQUEIRA, D.A; BARUD, H.S.; RIBEIRO, S.J.L.; MESSADDEQ, Y. Characterization of methylcellulose produced from sugar cane bagasse cellulose: Crystallinity and thermal properties. *Polymer Degradation and Stability*, v. 92, p. 205-210, 2007.

GENNADIOS, A.; WELLER, C. L.; Edible films and coatings from wheat and corn proteins. *Food Technology*, v. 44, n. 10, p. 63-69, 1990.

GONTARD, N.; GUILBERT, S. Bio-packaging: technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin. *Boletim do SBCTA*, v. 30, n. 1, p. 3-15, 1995.

GOVENDER, T.; RILEY, T.; EHTEZAZI, T.; GARNETT, M. C.; STOLNIK, S.; ILLUM, L.; DAVIS, S. S. Defining the drug incorporation properties of PLA-PEG nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 199, p. 95-110, 2000.

GUTERRES, S.S; FESSI, H.; BARRAT, G.; DEVISSAGUET, J-P.; PUISIEUX, F. Poly (D,L-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 113, p. 57-63, 1995.

GUTERRES, S.S.; ALVES, M.P.; POHLMANN, A.R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous applications. *Drug Target Insights*, v. 2, p. 147-157, 2007.

- FRANKEL, E.N.; EVANS, C.D.; COONEY, P.M. Tocopherol oxidation in natural fats. *Agricultural and Food Technology*, v. 57, n. 1, p. 51-55, 1996.
- FUNAMI, T.; KATAOKAA, Y.; HIROE, M.; ASAI, I.; TAKAHASHI, R.; NISHINARI, K. Thermal aggregation of methylcellulose with different molecular weights. *Food Hydrocolloids*, v. 21, p. 46-58, 2007.
- HENSLEY, K.; BENAKSAS, E.J.; BOLLI, R.; COMP, P.; GRAMMAS, P.; HAMDHEYDARI, L.; MOU, S.; PYE, Q.N.; STODDARD, M.F.; WALLIS, G.; WILLIAMSON, K. S.; WEST, M.; WECHTER, W. J.; FLOYD, R. A. New perspectives on vitamin E: γ -tocopherol and carboxyethylhydroxychroman metabolites in biology and medicine. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 36, p. 1-15, 2004.
- HERALD, T.J.; HACHMEISTER, K.A.; HUANG, S.; BOWERS, J.R. Corn zein packaging materials for cooked turkey. *Journal of Food Science*, v. 61, p. 415-418, 1996.
- HIGUCHI, T. Rate of medicaments from ointment bases containing drugs in suspensions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 50, p. 874-875, 1961.
- HILST, M. A. S. Avaliação da Estabilidade de óleo de soja acondicionado em latas e na embalagem Tetra Brik. Campinas, 1999, 101p. Dissertação Mestre em Tecnologia de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- HRAS, A. R., HADOLIN, M., KNEZ, Z. e BAUMAN, D. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chemistry*, v. 71, p. 229-233, 2000.
- HUANG, C.H.; WENG, Y.M. Inhibition of lipid oxidation in fish muscle by antioxidant incorporated polyethylene film. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 22, p. 199-209, 1998.
- ISNARDY, B., WAGNER, K., ELMADFA, I. Effects of α -, γ - and δ -tocopherols on the autoxidation of purified rapeseed oil triacylglycerols

in a system containing low oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 7775-7780, 2003.

JOHNSON, A.; PETERSON, M. Componentes específicos de los aceites vegetales: tocoferoles. In: Libro 10° Aniversario A & G: Recopilación de Artículos Técnicos. Tomo II. Ediciones 1 a 41, 1990-2000. Argentina: Asociación Argentina de Grasas y Aceites, 2001. p.733.

KALIA, Y.N; GUY, R.H.; Modeling transdermal drug release. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 48, p. 159-172, 2001.

KANIS, L. A. Study of poly(ethylene oxide)/Carbopol blends trough thermal analysis and infrared spectroscopy. *Science Polymer*, n. 41, p. 3303-3309, 2000.

KERRY, J.P.; O'GRADY, M.N.; HOGAN, A.S. Past, current and potential utilization of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. *Meat Science*, v. 74, p. 113-130, 2006.

KESTER, J.J.; FENNEMA, O. R. Edible films and coatings: a review. *Food Technology*, v. 10, p. 47-59, 1986.

LABUZA, T.P.; BREENE, W.M. Applications of "active packaging" for improvement of shelf-life and nutritional quality of fresh and extended shelf-life foods. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 13, p. 1-69, 1989.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, v. 46, p. 244-282, 2007.

LEE, C.H.; AN, D.S.; LEE, S.C.; PARK, H.J.; LEE, D.S. A coating for use as an antimicrobial and antioxidative packaging material incorporating nisin and α -tocopherol. *Journal of Food Engineering*, v. 62, p. 323-329, 2004.

- LEGRAND, P.; BARRAT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems. *Pharma Sciences*, v. 9, n. 5, p. 411-418, 1999.
- LI, B.; KENNEDY, J. F.; PENG, J. L.; YIE, X.; XIE., B. J.; Preparation and performance evaluation of glucomannan-chitosan-nisin ternary antimicrobial blend film. *Carbohydrate Polymers*, v. 65, p. 488-494, 2006.
- LOPES, C.M.; LOBO, J.M.S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 41, n. 2, 2005
- MARTIN, A.; SWARBRICK, J. E.; CAMMARATA, A. *Physycal Pharmacy*. 4 ed. Pensilvania: Lippincott Williams & Willians, 1993.
- MIN, S.; KROCHTA, J.M. Ascorbic acid-containing whey protein film coatings for control of oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 2964-2969, 2007.
- MUKHOPADHYAY, A. K. Antioxidants Natural and Syntetics: *Amani Int'l Publishers*, p. 1-137, 2006
- NELSON, K. L.; FENNEMA, O. R. Methylcellulose films to prevent lipid migration in confectionery products. *Journal of Food Science*, v. 56, n. 2, p. 504 - 509, 1991.
- NERÍN, C.; TOVAR, L.; DJENANE, D.; CAMO, J.; SALAFRANCA, J.; BELTRÁN, J.A.; RONCÁLEZ, P. Stabilization of beef meat by a new active packaging containing natural antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 7840-7846, 2006.
- NOGALA-KALUCKA, M.; KORCZAK, J.; WAGNER, K.H.; ELMAFDA, I. Tocopherol composition of deodorization and their antioxidative activity. *Nahrung-Food*. v. 48, p. 34-37, 2004.
- O'BRIEN, N. M.; O'CONNOR, T. P. Lipid Oxidation. *Lipids*., p. 1600, 2002.

OKADA, M. Chemical syntheses of biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science*, v. 27, p. 87-133, 2002.

PEACOOK, A. J. Handbook of polyethylene: structure, properties and applications, *Marcel Dekker Inc.*, New York, 2000.

PITT, C.G. Poly- ϵ -caprolactone and its copolymers. In: Chasin M, Langer R, editors. biodegradable polymers as drug delivery systems. New York: *Marcel Dekker*. p. 71–120, 1990.

POKORNÝ, J.; PARKANYIOVÁ, J. Lipids with antioxidant properties. In: AKOH, C.C.; LAI, O-M. Healthful Lipids. Champaign: AOCS Press, 2005.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMAN, E.; DOELKER, E.; FESSI, H. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. *Pharmaceutical Research*, v. 15, p. 1056-1062, 1998.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. *Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos*. Química Nova, v.29, n.4, p.755-760, 2006.

REZK, B. M.; HAENEN, G. R. M.; VIJGH, W. J. F. van der, BAST, A. The extraordinary antioxidant activity of vitamin E phosphate. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1683, p. 16-21, 2004.

ROONEY, M.L.; HOLLAND, R.V.; SHORTER, A.J. Photochemical removal of headspace oxygen by a singlet oxygen reaction. *Journal of Science of Food and Agriculture*, v. 32, n. 3, p. 265-272, 1981.

SALMIERI, S.; LACROIX, M. Physicochemical properties of alginate/polycaprolactone-based films containing essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 10205-10214, 2006.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; PONTES, A.; PEREIRA, V. M. W.; CAETANO, M. N. P. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 24, p. 71-80, 2000.

- SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, v. 26, p. 726-737, 2003.
- SEKIGUCHI, Y.; SAWATARI, C.; KONDO, T. A gelation mechanism depending on hydrogen bond formation in regioselectively substituted O-methylcelluloses. *Carbohydrate Polymers*, v. 53, p. 145-153, 2003.
- SEKHON, B. S. Food nanotechnology: an Overview Nanotechnology. *Science and Applications*, v.3, p. 1-15, 2010.
- SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Antioxidants: regulatory status. In: SHAHIDI, F. *Bailey's Industrial Oil & Fat Products*. 6.ed., v.1. EUA: Wiley-Interscience, 2005.
- SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*, v. 21, n.1, 1999.
- SOARES, N.F.F; HOTCHKISS, J.H. Naringinase Immobilization in Packaging Films for Reducing Naringin Concentration in Grapefruit Juice. *Journal of Food Science*, v. 63:1. p. 61-65, 1998.
- SOARES, N.F.F.; SILVA, W.A.; PIRES, A.C.S.; CAMILLOTO, G.P.; SILVA, S.S. Novos desenvolvimentos e aplicações em embalagens de alimentos. *Revista Ceres*, v. 56(4), p. 370-378, 2009.
- SOBRAL, P. J. A. Influência de espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 35, n. 6, p. 1251-1259, 2000.
- SONG, Y.; GAO, L.; LI, L.; Zheng, Q. Influence of gliadins on rheology of methylcellulose in 70% (v/v) aqueous ethanol. *Food Hydrocolloids*, v. 24, p. 98-104, 2010.
- SOTHORNVIT, R.; PITAK, N. Oxygen permeability and mechanical properties of banana films. *Food Research International*, v. 40, p. 365-370, 2007.

SOZER, N.; KOKINI, J.L. Review Nanotechnology and its applications in the food sector. *Trends in Biotechnology*, v. 27, p. 82-89, 2009.

SUJA, K.P.; ABRAHAM, J.T.; THAMIZH, S.N.; JAYALEKSHMY, A.; ARUMUGHAN, C. Antioxidant efficacy of sesame cake extract in vegetable oil protection. *Food Chemistry*, v. 84, p. 393-400, 2004.

TAWFIK, M.S.; HUYGHEBAERT, A. Interaction of Packaging Materials and Vegetable Oils: Oil Stability. *Food Chemistry*, v. 64, p. 451-459, 1999.

TOMSIC, M.; PROSSNIGG, F.; GLATTER, O. A thermoreversible double gel: Characterization of a methylcellulose and κ -carrageenan mixed system in water by SAXS, DSC and rheology. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 322, p. 41-50, 2008.

TOVAR, L.; SALAFRANCA, J.; SÁNCHEZ, C.; NERÍN, C. Migration studies to assess the safety in use of a new antioxidant active packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 5270-5275, 2005.

VALENZUELA, A.; NIETO, S. Los antioxidantes: protectores de la calidad en la industria alimentaria. In: Libro 10° Aniversario A & G: Recopilación de Artículos Técnicos. Tomo III. Ediciones 1 a 41, 1990-2000. Argentina: Asociación Argentina de Grasas y Aceites, p. 753, 2001.

VERLEYEN, T.; VERHE, R.; HUYGHEBAERT, A; DEWETTINCK, K.; DE GREYT, W. Identification of α -tocopherol oxidation products in triolein at elevated temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 1508- 511, 2001.

VERMEIREN, L; DEVLIEGHERE, F; VAN BEEST, M; DEVEBERE, J. Developments in the active packaging of foods. *Trends in Food Science and Technology*. v. 10, p. 77-86, 1999.

VERMEIREN, L.; DEVLIEGHERE, F.; DEVEBERE, J. Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts. *Food Additives and Contaminants*, v. 19, p. 163-171, 2002

- WANASUNDARA, P.K.J.P.D.; SHAHIDI, F. Antioxidants: Science, technology and applications. In: SHAHIDI, F. *Bailey's Industrial Oil & Fat Products*. 6.ed., v.1. EUA: Wiley-Interscience, 2005.
- WESSLING, C.; NIELSEN, T.; GIACIN, J.R. Antioxidant ability of BHT and α -tocopherol-impregnated LDPE film in packaging of oatmeal. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 81, p. 194-201, 2000.
- WOODRUFF, M.A.; HUTMACHER, D.W. The return of a forgotten polymer –Polycaprolactone. *Progress in Polymer Science*, v. 35, p. 1217-1256, 2010.
- YAM, K.L; TAKHISTOV P.T; MILTZ, J. Intelligent Packaging: Concepts and Applications. *Journal of Food Science*, v. 70:R1-R10, 2005.
- YANG, L.; PAULSON, A. T. Mechanical and water vapor properties of edible gellan films. *Food Research International*, v. 33, p. 563-570, 2000.
- YANISHLIEVA-MASLAROVA, N.V. Inhibiting oxidation. In: Pokomy J, Yanishlieva N & Gordon M (Eds.) Antioxidants in food: Practical applications. Cambridge, Woodhead Publishing, p. 23-70, 2001.
- YE, D.; MONTANE, D.; FARRIOL, X. Preparation and characterisation of methylcellulose from annual cardoon and juvenile eucalyptus. *Carbohydrate Polymers*, v. 61, p. 446-454, 2005.
- YOO, S-H.; SONG, Y-B.; CHANG, P-S.; LEE, H.G. Microencapsulation of α -tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 38, p. 25-30, 2006.
- YOSHIDA, Y.; NIKI, E.; NOGUCHI, N. Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. *Chemistry and Physics of Lipids*. v. 123, p. 63-75, 2003.